

RO/CH

PCT/CH 03 / 00665

03. Feb 2004

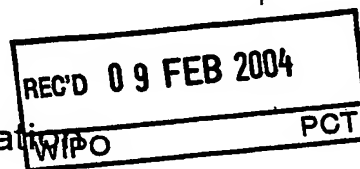
( 03.02.2004 )



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets



Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-  
gen stimmen mit der  
ursprünglich eingereichten  
Fassung der auf dem näch-  
sten Blatt bezeichneten  
europäischen Patentanmel-  
dung überein.

The attached documents  
are exact copies of the  
European patent application  
described on the following  
page, as originally filed.

Les documents fixés à  
cette attestation sont  
conformes à la version  
initialement déposée de  
la demande de brevet  
européen spécifiée à la  
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

02022868.0

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

R C van Dijk

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



Anmeldung Nr:  
Application no.: 02022868.0  
Demande no:

Anmeldetag:  
Date of filing: 14.10.02  
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Cardion AG  
Max-Planck-Strasse 15a  
40699 Erkrath  
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:  
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.  
If no title is shown please refer to the description.  
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Transplantierbare Zelle und ihre Verwendung zur Prophylaxe und/oder Therapie von  
Transplantationsfolge- und/oder Autoimmunkrankheiten

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)  
revendiquée(s)  
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/  
Classification internationale des brevets:

C12N5/00

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of  
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE SK TR

14. Oktober 2002

Cardion AG

2002CAR003EP

Transplantierbare Zelle und ihre Verwendung zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolge- und/oder Autoimmunkrankheiten

Die Erfindung betrifft eine humane oder tierische nicht-totipotente Zelle, die mindestens eine Nukleinsäure enthält, welche für mindestens einen Immunmodulator unter der Kontrolle eines durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbaren Genschaltermoleküls kodiert sowie ihre Herstellung und Verwendung zur Transplantation, zur Inhibierung einer Transplantationsabstoßungsreaktion sowie zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolge- und/oder Autoimmunkrankheiten.

Eine Vielzahl von menschlichen Erkrankungen beruhen auf dem Absterben oder der Fehlfunktion von spezifischen Zellen, Geweben oder Organen und kann medikamentös oft nur unzureichend behandelt werden. Die konventionelle Therapie bestand bisher darin, das geschädigte Gewebe oder Organ durch Transplantation von gesunden Zellen, Geweben oder Organen, wie z.B. Herz, Lunge, Niere, Pankreas oder Zellen bzw. Gewebe hieraus zu ersetzen, die von gesunden menschlichen Spendern erhalten wurden. Aufgrund der bestehenden Knappheit an Organspendern kann der Bedarf an Spendergewebe jedoch nur unzureichend gedeckt werden. Dieser Mangel könnte durch die Transplantation von Geweben bzw. Zellen aus speziell gezüchteten nicht-humanen Spender-Säugetieren behoben werden. Alternativ können Ersatzzellen auch aus Zelllinien gewonnen werden. Diese Zellen können ebenfalls humanen oder nicht-humanen Ursprunges sein.

Bei jeder Transplantation von nicht-humanen Zellen, Geweben oder Organen in einen humanen Organismus (Xenotransplantation) bzw. von humanen Spenderzellen, Spendergewebe oder Spenderorganen eines genetisch nicht-identischen Menschen in einen humanen Empfänger (Allotransplantation) besteht jedoch das Problem der immunvermittelten Transplantatabstoßung. Die Abstoßung basiert auf der Erkennung der auf den Spenderzellen vorhandenen Histokompatibilitätsantigene als Fremdproteine, wodurch eine gegen das Transplantat gerichtete Immunantwort ausgelöst wird. Die Immunantwort gegen allogene und xenogene Zellen, Gewebe und Organe beruht auf zahlreichen komplexen Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Zellen (z.B. B-Zellen, T-Zellen, Antigen präsentierenden Zellen) des Immunsystems und kann letztlich zur Abstoßung der/des übertragenen Zellen, Gewebes oder Organs führen. Zur Unterdrückung der Immunreaktionen muss der Empfänger daher mit Medikamenten, sogenannten Immunmodulatoren, behandelt werden, die das Immunsystem unterdrücken oder eine Toleranz des Empfängers gegenüber

dem Transplantat bewirken und somit eine solche Abstoßungsreaktion verhindern.

Als Immunmodulatoren werden z.B. Steroide (Prednisolon und Derivate), Calcineurininhibitoren (Cyclosporin A, Tacrolimus), Rapamycin (Sirolimus), Mycophenolat Mofetil (MMF), Azathioprin (Imuran), Lymphocyten-Antiseren (ALG – anti-Leukocyte-Globulin, ATG – anti Thymocyte Globulin) oder monoklonale Antikörper (anti-CD25: Zenapax, Simulect) verwendet.

Während Antikörpertherapien als unterstützende Therapien während der ersten Wochen und Monate nach der Transplantation verabreicht werden (Induktionstherapie), werden die Calcineurininhibitoren, Steroide und oft MMF oder Imuran in der Regel vom Zeitpunkt der Transplantation an über den gesamten Zeitraum, in dem der Patient das Transplantat trägt, d.h. teilweise lebenslang, administriert. Unabhängig von der Art, Wirkungsweise und Kombination der derzeit verwendeten immunmodulatorischen Substanzen werden die Medikamente jedoch zumeist intravenös oder oral verabreicht und damit über den gesamten Körper des Patienten verteilt. Damit gelangen sie nicht nur an ihren Wirkungsort, d.h., in das transplantierte Organ oder Gewebe, oder den Ort an dem die transplantierten Zellen anwachsen, sondern auch in alle anderen Gewebe und Organe des Organismus. Dies führt zu einer generellen Unterdrückung der Immunabwehr, die nicht auf das Transplantat begrenzt ist. In den zietfremden Geweben und Organen beeinträchtigen sie die Funktion des Immunsystems und verhindern damit die physiologische Funktionsweise vieler Organe, was zu zahlreichen Nebenwirkungen führen kann.

Zu den bedeutendsten Nebenwirkungen konventioneller Immunmodulatortherapie zählen dabei Bluthochdruck, Nieren- und Leberschäden, das vermehrte Auftreten von opportunistischen Infektionen und eine erhöhte Rate von verschiedenen malignen Entartungen wie z.B. Krebs und lymphoproliferative Erkrankungen. So kann z.B. die Infektion mit dem Cytomegalievirus, die normalerweise nur mit geringen Symptomen verläuft, in immunsupprimierten Patienten zur Ausbildung von Hepatitis, Lungen- und Hirnhautentzündungen führen und ist damit eine Hauptursache für die erhöhte Sterblichkeitsrate von Transplantatempfängern (Transplantation Clinical Management, Vol. 5, 2000 Medscape, Inc., Web MD Health Network, NY, USA). Andere Studien belegen, dass immunsupprimierte Allograft-Empfänger nach konventioneller Behandlung ein drei- bis vierfach erhöhtes Krebsrisiko haben, welches bei bestimmten Krebsarten sogar um den Faktor 20-500 ansteigen kann (Penn I., Clin. Transpl. 147-158, 1998). Zusätzlich können Immunmodulatoren, insbesondere Immunsuppressiva, unabhängig von ihrer Wirkung auf das Immunsystem generell toxische Eigenschaften aufweisen. So verursachen Calcineurininhibitoren oftmals Niereninsuffizienz, Bluthochdruck, Hyperlipidämie und die Entwicklung eines Diabetes mellitus. Weiterhin führt die regelmäßige Medikamentenbehandlung zu einer starken Beeinträchtigung der Lebensqualität und wird daher oftmals von den Patienten nicht in dem medizinisch notwendigen Ausmaß durchgeführt.

Weiterer Nachteil ist, dass die Medikamente in relativ hoher Dosierung verabreicht werden müssen, damit sie nach Verteilung über den gesamten Blutkreislauf noch die therapeutische Wirkkonzentration am Transplantationsort erreichen. Hierdurch wird das Auftreten der genannten Nebenwirkungen noch begünstigt bzw. verstärkt.

Um diesen Tatsachen entgegenzuwirken, wurden in den letzten Jahren zahlreiche neuartige

immuntherapeutische und begleitende diagnostische Ansätze entwickelt.

Ein klinisch erprobter Ansatz zur Reduktion der Nebenwirkungen der Immunmodulation besteht z.B. darin, neuentwickelte immunreaktive Medikamente in niedrigen Konzentrationen zu kombinieren und damit Standardtherapeutika (z.B. Steroide, Cyclosporin A) zu ersetzen. Dies wurde z.B. erfolgreich bei der Transplantation von allogen Inselzellen zur Behandlung des Diabetes mellitus durchgeführt, bei der die diabetogene Wirkung von Glucokortikoiden durch die Verwendung einer Kombination aus Daclizumab, Sirolimus und niedrigdosiertem Tacrolimus umgangen wurde (Shapiro J., The New England Journal of Medicine, Vol 343, N. 4, 230-238, 2000). Die Nebenwirkungen der einzelnen Immunmodulatoren dieser Kombination wie z.B. das Absinken des Leukozytenspiegels, das Auftreten von Mundabszessen und Verdauungsstörungen, konnten jedoch auch bei dieser Behandlung nicht vermieden werden.

Ein weiterer Therapieansatz könnte darin bestehen, im Patienten durch Verabreichung neuartiger immunmodulatorischer Substanzen eine immunologische Toleranz gegenüber dem Fremdgewebe zu erreichen. Toleranz ist in diesem Zusammenhang als die fehlende Immunantwort bzw. Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat ohne fortwährende Immunsuppression charakterisiert. Die Verabreichung solcher immunmodulatorischen Substanzen erfolgt nach den üblichen, dem Fachmann bekannten, Methoden (siehe z.B. WO 00/12138; WO 97/41232; WO 96/26274; WO 01/87330; Ferrari-Lacraz et al., The Journal of Immunology, 2001, Vol.167 S. 3478-3485; Kim et al., The Journal of Immunology, 1998, 160: 5742-5748; Penn, Transplant Proc, 1991, 23:1101; Beveridge et al., Lancet, 1984, 1:788).

Ein Nachteil des herkömmlichen Therapieansatzes ist, dass auch Toleranz induzierende Immunomodulatoren im Normalfall systemisch (z.B. intravenös) administriert werden. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Immunomodulatoren als therapeutische Produkte aus natürlichen Quellen isoliert oder als rekombinante Moleküle biotechnologisch hergestellt werden müssen, um sie dann dem Patienten von extern zu verabreichen. Produktionsbedingte Aspekte können jedoch dazu führen, dass ein Immunmodulator in nativer Form oder als rekombinantes Molekül nicht in ausreichender Menge bzw. Aktivität isoliert oder hergestellt werden kann. Zusätzlich kann die ex vivo Produktion des Immunmodulators die Zugabe von Substanzen erforderlich machen, die ein weiteres gesundheitliches Risiko für den Patienten bedeuten können (z.B. Substanzen, die aus tierischen Organismen isoliert wurden und daher potentiell Zoonosen übertragen können). Dies kann zur Folge haben, dass nicht alle Patienten in ausreichender Weise mit dem Immunmodulator behandelt werden können oder dass die Behandlung mit zusätzlichen gesundheitlichen Risiken verbunden ist.

Im Rahmen der Erfindung wurde die Aufgabe gestellt, eine Immuntherapie zu entwickeln, die die oben beschriebenen Nachteile vermeidet bzw. verringert, insbesondere, die ihre immunmodulatorische, insbesondere immunsuppressive, Wirkung im Organismus genau dort entfaltet, wo die Immunantwort aktiviert wurde bzw. aktivierbar ist, d.h. am Lokalisationsort der transplantierten

Zellen oder Organe, und gleichzeitig eine zeitlich und mengenmäßig regulierbare immunmodulatorische Wirkung ermöglicht.

Erfindungsgemäß wurde eine kontrollierbare Expression des Immunmodulators in Zellen mit Hilfe eines regulierbaren Genexpressionssystems erreicht.

Mit Hilfe dieses regulierbaren Genexpressionssystems ist es möglich, einen Immunmodulator lokal (z.B. in Zelltransplantaten) und dosiert zu produzieren. Eine solche regulierbare Produktion von Immunmodulatoren konnte bisher nicht gezeigt werden. Um so überraschender war der Befund, in transienten Zellkulturversuchen eine regulierbare Produktion des Immunmodulators MutIL-15/mFc zu erhalten.

Dieses regulierbare Expressionssystem ermöglicht es, dass Immunmodulatoren gar nicht mehr oder nur noch in geringen Konzentrationen kontinuierlich systemisch verabreicht werden müssen.

Ein weiterer erheblicher Vorteil der Erfindung liegt darin, dass auch an dem Lokalisationsort des Transplantats keine anhaltende Suppression der Immunantwort erfolgen muss, wenn dies aus medizinischer Sicht nicht erforderlich ist, sondern diese nur bei Bedarf aktiviert wird. Dadurch werden Nebenwirkungen sowie eine Belastung des Körpers, insbesondere der Transplantatregion, reduziert. Auch für den Patienten bedeutet dies eine physische und psychische Entlastung, da er nicht kontinuierlich auf die Verabreichung von Immunmodulatoren, insbesondere Immunsuppressiva, angewiesen ist. Unter Immunsuppressiva in diesem Sinne sind Substanzen zu verstehen, die eine Immunantwort, hervorgerufen durch das Transplantat, insbesondere Zelle(n), Gewebe und/oder Organ(e), in dem Organismus ganz oder teilweise inhibieren.

Zusätzlich liefert diese Erfindung den Vorteil, dass der Immunmodulator nicht mehr aus einer nativen Quelle isoliert oder rekombinant hergestellt und aufgereinigt werden muss. Der Immunmodulator wird in therapeutisch aktiver Menge und Form im Empfängerorganismus und/oder am Wirkort in vivo gebildet und behält somit seine volle native Aktivität.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft daher eine transplantierbare humane oder tierische nicht-totipotente Zelle, die mindestens eine Nukleinsäure enthält, die für mindestens einen Immunmodulator unter der Kontrolle eines durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbaren Genexpressionssystems kodiert.

Unter einer Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man eine RNA oder DNA, insbesondere genomische DNA, rekombinant hergestellte DNA, cDNA oder synthetische DNA, die beispielsweise auf Phosphoramidierungsebene synthetisiert wurde. Ebenfalls sind Kombinationen und/oder Modifikationen von Nukleotiden dieser Nukleinsäuren umfasst. Weiterhin umfasst dieser Begriff einzel- und doppelsträngige Nukleinsäuren.

Ebenso umfasst sind Nukleinsäuren, die funktionell verknüpfte Komponenten beinhalten, beispielsweise ein oder mehrere Gene oder aktive Teile davon kodierend für einen oder mehrere Immunmodulatoren sowie mindestens ein regulierbares Genexpressionssystem, dessen Aktivierungszustand durch Zugabe einer Wirksubstanz reguliert wird, sowie regulierbare Elemente, beispielsweise Promotoren und regulative Nukleotidsequenzen sowie ein Polyadenylierungssignal, beispielsweise ein SV40-Polyadenylierungssignal. Die Komponenten sind funktionell verknüpft, wenn sie derart verbunden sind, dass unter dem Einfluss der Transkriptionsregulation die Sequenz(en) der enthaltenen Gene bzw. des Gens transkribiert werden bzw. wird.

Der Begriff Immunmodulator der vorliegenden Erfindung umfasst im wesentlichen jede Art von Molekül, das immunmodulatorische, insbesondere immunsupprimierende, Wirkung aufweist, beispielsweise Proteine, Fusionsproteine und lösliche Liganden, wobei unter einem Fusionsprotein ein Expressionsprodukt eines fusionierten Gens zu verstehen, das aus der Verknüpfung zweier oder mehrerer Gene oder Genfragmente entsteht.

Eine immunmodulierende Wirkung liegt vor, wenn die Immunantwort eines Organismus, einer Zelle und/oder eines Gewebes im wesentlichen inhibiert wird, beispielsweise durch eine veränderte oder unterdrückte Rezeptorbindung. Eine immunmodulierende Wirkung liegt ebenfalls vor, wenn eine immunologische Toleranz gegenüber einer/s transplantierten Zelle, Gewebe oder Organs bewirkt wird.

Die Wirkung des Immunmodulators ist beispielsweise:

- die Inhibierung einer durch T-Zellen vermittelten Antigenerkennung,
- die Inhibierung eines über einen Rezeptor auf einer T-Zelle vermittelten Signals,
- die Aktivierung eines über einen Rezeptor auf einer T-Zelle vermittelten Signals,
- die Inhibierung des Wachstums von T-Zellen,
- die Inhibierung von Molekülen die das Überleben von T-Zellen unterstützen
- die Inhibierung von Effektormolekülen von T-Zellen(wie TNF-alpha, IFN-gamma),
- die Inhibierung der Adhäsion von T-Zellen,
- die Inhibierung einer T-Zell-kostimulatorischen Interaktion (die Aktivierung eines Lymphozyten erfolgt über zwei Signale: zum einen erfolgt eine Stimulierung über den Antigenrezeptor, zum anderen erfolgt ein weiteres Signal zur klonalen Expansion und Differenzierung eines ungeprägten Lymphozyten; diese kostimulatorische Interaktion kann durch einen Immunmodulator inhibiert werden)
- die Inhibierung der Aktivierung, der Proliferation, des Überlebens, der Antigenpräsentation, des Signalisierens, und/oder der Effektorfunktionen von weiteren Zellen, die an einer Immunantwort

- beteiligt sind, wie z.B. allgemeine und spezielle antigenpräsentierende Zellen, insbesondere z.B. dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen B-Zellen, neutrophile Granulozyten und NK Zellen die Inhibierung der zellulären Interaktion von unterschiedlichen Zellen, entweder über Oberflächenrezeptoren oder über sekretierte Moleküle, wie z.B. Zytokine, Chemokine oder Wachstumsfaktoren, die an einer Immunantwort beteiligt sind, wie z.B. allgemeine und spezielle antigenpräsentierende Zellen, insbesondere z.B. dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen, neutrophile Granulozyten und NK Zellen,
- die Inhibierung der Migration von Zellen, die an einer Immunantwort beteiligt sind, wie z.B. spezielle antigenpräsentierende Zellen, insbesondere z.B. dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen, neutrophile Granulozyten und NK Zellen,
  - die Inhibierung von Komponenten des Komplementsystems
  - die Inhibierung von phagozytotischen Aktivitäten im Zusammenhang mit der Präsentation von Fremd- oder Autoimmunantigenen, oder durch die Bindung von Antikörpern an Antigene, und/oder
  - die Inhibierung von Entzündungsreaktionen.

Als Immunmodulatoren eignen sich beispielsweise Antikörper. Besonders bevorzugt handelt es sich um einen Antikörper gegen IL-15, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, IL-17, IL-18, IL-21, Interferon gamma, TNF-alpha, CD2, CD3, CD4, CD8, CD28, CD40, CD80, CD86 oder CD154 oder gegen deren Rezeptoren.

Ebenfalls bevorzugt Immunmodulatoren sind FasL, PD-L1 oder PD-L2.

Weitere bevorzugte Immunmodulatoren sind IL-15, IL-10, IL-4, IL-2, Interferon gamma oder TGF-beta, insbesondere als Fusionsprotein. Besonders bevorzugt umfasst das Fusionsprotein einerseits Wildtyp-IL-15, Wildtyp-IL-10, Wildtyp-IL-4, Wildtyp-Interferon gamma oder Wildtyp-TGF-beta und andererseits einem Fc-Fragment. Weiterhin besonders bevorzugt umfasst das Fusionsprotein einerseits mutiertes IL-15 oder mutiertes IL-2 und andererseits ein Fc-Fragment (siehe beispielsweise WO 97/41232; Kim et al., J Immunol. (1998), 160(12):5742-5748; WO 01/87330).

Weitere bevorzugte Immunmodulatoren sind Fusionsproteine aus einerseits TNF-alpha-Rezeptor (Typ 1 oder 2), ICOS, CTLA-4, PSGL-1, ICAM-1 oder VCAM-1 und andererseits einem Fc-Fragment.

Weitere bevorzugte Immunmodulatoren sind sekretierte Varianten von Zytokin- oder Wachstumsfaktorrezeptoren, wie z.B. IL-15Ralpha, IL-6, IL-7, IL-12, IL-17, IL-18 Rezeptoren,



beispielsweise als Varianten ohne Transmembrandomäne und zytoplasmatischem Schwanz, vorzugsweise als Fusionsprotein mit einem Fc-Fragment.

Vorzugsweise ist das Fusionsprotein ein chimäres Fusionsprotein. Geeignete Fusionsproteine sind beispielsweise IL-15 Derivate, umfassend IL-15 oder mutiertes IL-15 und ein heterologes Fc-Fragment.

Unter einem Fc(Fragment crystallizable)-Fragment ist das Fragment eines Antikörpers zu verstehen, das keine Antigene bindet. Das Fc-Fragment kann aus natürlicher Quelle stammen, rekombinant hergestellt werden und/oder synthetisiert werden. Entsprechende Methoden sind dem Fachmann bekannt.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist das Fc-Fragment ein Immunglobulin (Ig)G, insbesondere ein humanes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 und/oder ein analoges Säugetier IgG und/oder ein IgGM, insbesondere ein humanes IgM oder ein analoges Säugetier IgM und/oder ein murines IgG2a.

Die Immunmodulatoren können Wildtyp-Sequenzen oder auch mutierte Sequenzen aufweisen. Vorzugsweise liegen die Immunmodulatoren bereits in einer funktionell aktiven Form vor, beispielsweise in einer funktionell aktiven löslichen Form oder einer funktionell aktiven viralen Form. Unter einer löslichen Form ist ein Molekül zu verstehen, das nicht an eine Zellmembran gebunden ist, wie z.B. ein lösliches Rezeptormolekül. Unter einer viralen Form ist eine Proteinisoform zu verstehen, die endogen von einem Virusgenom kodiert wird, wie z.B. virales IL-10.

Unter einer mutierten Sequenz gemäß der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz zu verstehen, die Abweichungen zur Wildtyp-Sequenz durch beispielsweise Deletion, Addition, Insertion oder Substitution einer oder mehrerer Nukleotide bzw. Aminosäuren enthält, ohne jedoch die immunmodulatorische Wirkung vollständig zu verlieren.

Mutierte Immunmodulatoren im Sinne der vorliegenden Erfindung sind daher Moleküle, die vorzugsweise eine Sequenzhomologie von mindestens ungefähr 80%, vorzugsweise mindestens ungefähr 90%, besonders bevorzugt mindestens ungefähr 95%, am meisten bevorzugt mindestens ungefähr 99% der Sequenz zu der Wildtyp-Sequenz aufweisen.

Unter Sequenzhomologie im Sinne der vorliegenden Erfindung wird der Grad der Ähnlichkeit (% Positive) von zwei Sequenzen verstanden, die bei Polynukleotiden beispielsweise mit Hilfe von

BLASTN 2.0.14 bestimmt wird, wobei der Filter=off gesetzt ist und BLOSUM 62 ist (Altschul et al. 1997, Nucl. Acids Res., 25: 3389-3402). Die Sequenzhomologie kann mit gängigen Sequenzhomologie-Programmen z. B. im Internet unter <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/SearchLauncher/> überprüft werden.

Unter dem Begriff regulierbares Genexpressionssystem im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man die Kombination aus einer Sequenz kodierend für ein Genschaltermolekül und eine Genschalterbindesequenz, wobei die Bindung des Genschaltermoleküls an die Genschalterbindesequenz durch die Zugabe einer Wirksubstanz reguliert wird, wodurch eine Kontrolle der Expression eines Zielgens, hier ein Zielgen kodierend für einen Immunmodulator, erfolgt (siehe auch Burcin et al. 1998, Frontiers in Bioscience 3: c1-7).

Generell ist es möglich, dass ein Genschaltermolekül durch Bindung an eine geeignete Genschalterbindesequenz die Transkription des Zielgens aktivieren oder inhibieren kann. Die Aktivierung kann darauf beruhen, dass das Genschaltermolekül z.B. Kontaktstellen für die RNA-Polymerase und/oder beteiligte Transkriptionsfaktoren zur Verfügung stellt. Die Inhibierung kann dadurch bewirkt werden, dass das Genschaltermolekül die für den Transkriptionskomplex erforderlichen DNA-Bindungsstellen durch seine Bindung an die DNA blockiert und dadurch unzugänglich für beispielsweise die RNA-Polymerase und/oder beteiligte Transkriptionsfaktoren macht.

Die Zugabe einer Wirksubstanz kann die Transkription des Zielgens positiv (Aktivierung) oder negativ (Inhibierung) beeinflussen. Beispielsweise wird das Zielgen in Abwesenheit der Wirksubstanz nicht exprimiert. Nach Zugabe der Wirksubstanz bindet diese an das Genschaltermolekül und verursacht dadurch die Aktivierung und Bindung des Genschaltermoleküls an die Genschalterbindesequenz, wodurch nachfolgend die Transkription des Zielgens initiiert wird. Ein weiteres Beispiel ist, dass das Genschaltermolekül in Abwesenheit der Wirksubstanz an die DNA bindet und die Transkription aktiviert. Nach Zugabe und Bindung der Wirksubstanz wird das Genschaltermolekül inaktiviert und die Transkription des Zielgens wird beendet.

Unter dem Begriff Genschaltermolekül versteht man ein Molekül, vorzugsweise ein Protein, insbesondere ein Fusionsprotein, enthaltend eine Bindungsstelle für eine Wirksubstanz und eine Transkriptionsaktivierungsdomäne, das nach Bindung der Wirksubstanz seinen Aktivierungszustand verändert.

Unter dem Begriff Genschalterbindesequenz im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man vorzugsweise eine 5'-stromaufwärts vom Translationsstart (+1) des Gens, oder aktiven Teiles hiervon, welches für einen Immunmodulator kodiert, gelegene Nukleinsäuresequenz, welche die Transkription des Zielgens, insbesondere bezüglich der Transkriptionsrate und/oder der Gewebespezifität,

kontrolliert oder die Translation kontrolliert. An diese Genschalterbindesequenz ist mittelbar oder unmittelbar eine regulatorische Nukleinsäuresequenz mit Promotoraktivität, vorzugsweise ebenfalls mit Enhanceraktivität gebunden.

Die Funktionsweise des erfindungsgemäßen regulierbaren Genexpressionssystems kann beispielsweise wie folgt beschrieben werden:

Wenn kein Genschaltermolekül an die Genschalterbindesequenz gebunden ist, erfolgt keine Expression des gekoppelten Zielgens und in diesem Fall wird kein Immunmodulator produziert. Bei Zugabe einer Wirksubstanz bindet diese beispielsweise an die Dimerisierungsdomäne des Genschaltermoleküls. Durch diese Bindung entsteht eine Konformationsänderung der Dimerisierungsdomäne, die eine Dimerisierung zweier Genschaltermoleküle und die nachfolgende Bindung an die Genschalterbindesequenz bewirkt. Durch diese Bindung wird die Aktivierungsdomäne des Genschaltermoleküls in die Nähe des minimalen TATA Promotors gebracht und somit die Transkription des gekoppelten Zielgenes kodierend für einen Immunmodulator initiiert. Nach beendeter Zugabe der Wirksubstanz wird die Bindung des Genschaltermoleküls an die Genschalterbindesequenz gelöst und somit die Zielgenexpression beendet.

Das Genschaltermolekül der vorliegenden Erfindung ist demnach durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbar, z.B. inhibierbar oder aktivierbar, bevorzugt aktivierbar und bindet dann an die Genschalterbindungsstelle.

Unter bevorzugter Wirksubstanz ist eine pharmakologisch verträgliche Substanz zu verstehen, die unmittelbar oder mittelbar die regulierte Expression eines Gens oder mehrerer Gene über dessen/deren Genschalter(s) bewirkt, beispielsweise Mifepriston, Tetracyclin, Doxycyclin oder Rapamycin.

Das regulierte Genexpressionssystem der vorliegenden Erfindung ist insbesondere ein Progesteron-Genexpressionssystem, welches einen Genschalter umfasst, der einen artifiziell zusammengesetzten Transkriptionsfaktor darstellt, bestehend aus einer GAL4-DNA-Bindedomäne (Gal4-DBD), einer Dimerisierungsdomäne, abgeleitet von einem mutierten Progesteronrezeptor mit verkürzter Ligandenbindungsstelle (hPR-LBD), und einer Aktivierungsdomäne der p65-Untereinheit des humanen NF- $\kappa$ B Proteins (p65-AD). Die Genschalterbindesequenz ist eine Nukleotidsequenz bestehend beispielsweise aus einer 17-Nukleotid langen GAL4-Bindungssequenz mit anschließenden minimalen TATA Promotor, an den das entsprechende Zielgen gekoppelt wird. Ein solches regulierbares Genexpressionssystem mit den genannten Genschalterkomponenten Gal4-DBD/hPR-LBD/p65-AD ist beispielsweise in Wang et al. 1994, PNAS 91:8180-8184 oder Wang et al. 1997, Gene Therapy 4: 432-441 beschrieben. Die in diesem System geeignete Wirksubstanz ist

beispielsweise Mifepriston, ein artifizielles, nicht im Säugetier vorkommendes hormonähnliches Molekül, das spezifisch an die Dimerisierungsdomäne des Genschaltermoleküls bindet und diesen durch die dadurch bewirkte Dimerisierung aktiviert.

Ein weiteres regulierbares Genexpressionssystem der vorliegenden Erfindung ist ein Tetracyclin-Genexpressionssystem, das ein durch Tetracyclin (Tet) oder das Derivat Doxycyclin (Dox) induzierbares System darstellt, bei dem das Genschaltermolekül aus einem Tet Transaktivatorprotein besteht. Dieser Transaktivator (tTA) ist ein Fusionsprotein aus einer VP16 Aktivierungsdomäne und dem Tet Repressor (TetR) von *Escherichia coli*. In Abwesenheit von Tetracyclin hat der tTA eine hohe Affinität zu seiner Genschalterbindestelle, dem Tet-responsiven Element (TRE), und aktiviert die Expression des Zielgens. Bei Zugabe der Wirksubstanz Tetracyclin wird die DNA-Bindung und somit die Zielgenaktivierung inhibiert. Dieses regulierbare Genexpressionssystem wird beispielsweise in Gossen 1995, Science 268: 1766-1769; Fruh 1995, Nature 375:415-418; Chao et al. 1998, Mol. Cell. Biol. 18 (8): 4883-4898; Halappanavar et al. 1999, J. Biol. Chem. 274 (52): 37097-37104 oder van der Vlag et al. 2000, J. Biol. Chem. 275 (1): 697-704 beschrieben.

Eine Modifikation dieses regulatorischen Tet Systems ist der reverse Transaktivator (rtTA). In diesem System ist der Wildtyp TetR durch einen mutierten TetR (rTetR) ersetzt, wodurch das Fusionsprotein die Genschalterbindestelle der DNA nur in Anwesenheit von Doxycyclin bindet und somit gekoppelte Zielgene induziert, wie beispielsweise in Gossen 1995, Science 268: 1766-1769; Gossen et al. 1992, PNAS 89: 5547-5551; Linstedt et al. 1997, Mol. Biol. Cell 8: 1073-1087; Mehlen et al. 1998, Nature 395: 801-804 oder Joosse et al. 2000, Hum. Mol. Genet. 9: 3075-3082 beschrieben.

Ein weiteres regulierbares Genexpressionssystem der vorliegenden Erfindung ist ein Rapamycin-Genexpressionssystem. Hierbei handelt es sich um eine durch die Wirksubstanz Rapamycin vermittelte induzierbare Dimerisierung der Proteine FKBP12 und FRAP. Eine Dimerisierung dieser beiden Proteine bewirkt eine DNA-Bindung der an FRAP gebundenen Aktivierungsdomäne und somit das Anschalten eines gekoppelten Zielgenes. Ein solches regulierbares Genexpressionssystem wird beispielsweise in Rivera et al. 1996, Nature Med 2: 1028-1032 beschrieben.

Die Verabreichung dieser Wirksubstanz kann nach dem Fachmann geläufigen Methoden erfolgen, beispielsweise intravenös, intraperitoneal, intramuskulär, subkutan, intrakranial, intraorbital, intrakapsulär, intraspinal, transmuskulär, topikal, oral oder über die Schleimhaut-Membran, z.B. die Nase oder die Mundhöhle. Weitere Methoden der Verabreichung sind beispielsweise die systemische oder lokale Injektion, die Perfusion oder die Katheter-basierte Verabreichung. Als orale Darreichungsform eignen sich z.B. Tabletten oder Kapseln. Eine Verabreichung über die Lunge erfolgt

beispielsweise mit Hilfe von Sprays und über die Haut in Form von Dispositorien, die unter die Haut implantiert werden. Transdermal-therapeutische Systeme (TTS) sind z.B. aus EP 0 944 398-A1, EP 0 916 336-A1, EP 0 889 723-A1 oder EP 0 852 493-A1 bekannt.

Vorzugsweise sind die Zellen transplantierbar. Transplantierbar im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet, dass die lebende Zelle an eine andere Stelle desselben Organismus oder in einen anderen (Empfänger-)Organismus übertragbar ist, wobei es sich vorzugsweise um eine nicht-tumorigene Zelle handelt, bzw. sofern es sich um eine von einer Tumorzelle abstammende Zelle handelt, diese vor der Transplantation entsprechend behandelt wird (z.B. durch mitotische Inaktivierung), um ihre Proliferation zu inhibieren (siehe z.B. WO 00/64459 und US 5,175,103; Pleasure et al. (1992), The Journal of Neuroscience, 12(5): 1802-1815“.

Die erfindungsgemäße transplantierbare humane oder tierische nicht-totipotente Zelle ist insbesondere eine Säugetierzelle, inklusive einer humanen Zelle, und stammt beispielsweise aus einem Menschen, einer Maus, einer Ratte, einem Meerschweinchen, einem Kaninchen, einer Kuh, einem Schaf, einer Ziege, einem Pferd, einem Schwein, einem Hund, einer Katze oder einem Affen, vorzugsweise aus einem Menschen.

Erfindungsgemäße Zellen sind beispielsweise Epithelzellen, Endothelzellen, Leberzellen, Herzzellen, Hautzellen, Muskelzellen, Nervenzellen, Knochenmarkszellen, Knochenzellen, Knorpelzellen, Blutzellen, Bindegewebszellen und Zellen aus der Bauchspeicheldrüse, der Niere, dem Auge oder der Lunge.

Unter einer nicht-totipotenten Zelle versteht man eine Zelle, die sich nicht selbständig zu seinem vollständigen Organismus zu entwickeln vermag.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei der Zelle um eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle. Vorzugsweise handelt es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle. Besonders bevorzugte Stammzellen, die aus adultem Gewebe stammen, aber nicht auf diese beschränkt sind, umfassen neuronale Stammzellen, Stammzellen aus dem Knochenmark, mesenchymale Stammzellen, hämatopoetische Stammzellen, epitheliale Stammzellen, sowie Stammzellen aus dem Verdauungstrakt, der Haut, dem Fettgewebe, dem Darm, der Plazenta und dem Duktus des Pankreas.

Eine Zelle der vorliegenden Erfindung umfasst auch eine Zelle, welche die oben beschriebene

erfindungsgemäße enthält, und die in ein Gewebe oder ein Organ eines humanen oder tierischen Organismus eingebracht wird, bevor und/oder nachdem dieses Gewebe oder Organ in denselben oder einen anderen humanen oder tierischen Organismus transplantiert wird.

Eine bevorzugte Ausführungsform betrifft eine erfindungsgemäße Zelle in Form einer Zelllinie.

Eine erfindungsgemäße Zelllinie kann beispielsweise hergestellt werden durch Transformation oder Infektion einer Zelllinie mit der oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Hilfe von Methoden, die dem Fachmann geläufig sind, beispielsweise Transfektion, Transformation oder Infektion.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kodiert die Nukleinsäure zusätzlich eine Selektionskassette, insbesondere ein geeignetes Transfektions-Markergen und/oder Differenzierungs-Markergen.

Eine Selektionskassette im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäuresequenz, die für mindestens ein Gen kodiert, das eine gezielte Selektion von bestimmten Zellen, beispielsweise transfizierter oder differenzierter Zellen, bewirkt.

Für eine solche Selektion können beispielsweise Differenzierungs-Markergene, Transfektions-Markergene und Reportergene verwendet werden. Als solche werden überwiegend Gene verwendet, die eine Resistenz gegen bestimmte toxische Substanzen, beispielsweise Antibiotika, vermitteln. Die häufigsten in diesem Zusammenhang verwendeten Antibiotika sind Neomycin, Hygromycin (hph), Zeocin (Sh ble) und Puromycin (pacA). Weitere Beispiele für derartige Gene, insbesondere zur Selektion von Stammzellen, sind beispielsweise Gene, die die Expression von Fluoreszenzmarkern, z.B. GFP, regulieren, mit deren Hilfe die zu selektierenden Zellen über fluoreszenzvermittelte Zell-Sortierung (FACS) aufgereinigt werden können. Weitere Beispiele von Selektionsmarkern sind Oberflächenmoleküle, z.B. Wachstumsfaktor-Rezeptoren, mit deren Hilfe Zellen über magnetische Immunobeads angereichert werden können (Bonini C., Science Vol 276, 1719-1724, 1997). Weitere Beispiele sind Gene, die für eine Enzymaktivität (z.B. Thymidinkinase) kodieren, die einen Vorläufer einer toxischen Substanz, sog. "Prodrug" (z.B. Ganciclovir) in eine toxische Substanz umwandeln. In diesem Fall kann eine Negativ-Selektion erfolgen, d.h., es überleben nur die Zellen, die den dem Gen vorgeschalteten Promotor nicht exprimieren.

Weitere Gene der erfindungsgemäßen Selektionskassette können lacZ (kodierend für  $\beta$ -Lactamase),

$\beta$ -Lactamase, Chloramphenicolacetyltransferase (CAT), Adenosin Deaminase (ADA), Dihydrofolatreduktase (DHFR), und Xanthinguaninphosphoribosyltransferase (XGPRT) sein. Dem Fachmann sind Reagenzien bekannt, die gegebenenfalls hinzugezogen werden können, um die Funktion dieser Gene zu sichern oder zu steigern, beispielsweise zusätzliche Nukleinsäuresequenzen.

In einer bevorzugten Ausführungsform kodiert die Nukleinsäure zusätzlich ein NK-Zellen-inhibierendes und/oder ein Killerzellen-inhibierendes Molekül, vorzugsweise ein humanes MHC-Klasse-I-Molekül, ein chimeres MHC-Klasse-I-Molekül oder ein virales MHC-Klasse-I-Homolog.

Unter Killerzellen ("killer cells") versteht der Fachmann eine heterogene Population mononukleärer Zellen mit spontanem oder erworbenem zytotoxischen Potential. Unter NK-Zellen (natürliche Killerzellen) sind Killerzellen zu verstehen, die natürlich vorhanden sind, d.h., nicht das Resultat einer Immunantwort sind und somit nicht Antigen-spezifisch induziert sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, welche für mindestens einen Immunmodulator und mindestens ein durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbares Genexpressionssystem kodiert, wie oben bereits näher beschrieben wurde.

Bevorzugt kodiert die Nukleinsäure ebenfalls für mindestens ein die Genexpression kontrollierendes Element. Unter diesen Elementen sind beispielsweise Promotoren oder regulative Nukleinsäuresequenzen zu verstehen. Durch diese sowie durch (nachfolgend näher erläuterte) Expressionsvektoren können geeignete Bedingungen für die Expression einer Nukleinsäure geschaffen werden. Im allgemeinen enthalten Expressionsvektoren die für die jeweilige Zelle bzw. das jeweils zu transkribierende Gen geeignete Promotoren.

Beispiele für regulierbare Elemente, die konstitutive Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren, die von der RNA-Polymerase III erkannt werden. Solche Promotoren für die konstitutive Expression in allen Zell- und Gewebetypen sind z.B. der pGK (Phosphoglyceratkinase)-Promotor, der CMV (Cytomegalievirus)-Promotor, der TK (Thymidinkinase)-Promotor, der EF1 $\alpha$  (Elongationsfaktor-1-alpha)-Promotor, der SV40 (Simian Virus)-Promotor, der RSV (Rous Sarcoma Virus)-Promotor und der pUB (Ubiquitin)-Promotor.

Beispiele für regulierbare Elemente, die zell- bzw. gewebespezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren oder Aktivatorsequenzen aus Promotoren oder Enhancern von solchen

Genen, die für Proteine kodieren, die nur in bestimmten Zelltypen exprimiert werden. Derartige Promotoren sind beispielsweise der Insulin-Promotor für Beta-Zellen des Pankreas, der Sox-2-Promotor für Nervenzellen, der Myosin-Schwere-Kette-Promotor für Muskelzellen, der VE-Cadherin-Promotor für Endothelzellen und der Keratinpromotor für Epithelzellen.

Weitere Beispiele für regulierbare Elemente, die eine regulierbare Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind der Tetracyclinoperator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor (Gossen M. et al., (1994) Curr. Opin. Biotechnol. 5, 516-20).

Ebenfalls kann die Expression über regulative Nukleotidsequenzen, welche die Expression mengenmäßig und/oder zeitabhängig beeinflussen, gesteuert werden. Hierzu zählen beispielsweise Enhancersequenzen, Leadersequenzen, Polyadenylierungssequenzen, IRES-Sequenzen, Introns, Insulatorsequenzen und Repressorsequenzen.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann auf einem oder mehreren Nukleinsäure-Molekülen lokalisiert sein. Erfindungsgemäß müssen im Falle mehrerer Nukleinsäure-Moleküle diese jedoch funktionell zusammenwirken. Im Sinne der vorliegenden Erfindung können z.B. (i) die Sequenz für das Genschaltermolekül, (ii) die Sequenz für den Immunmodulator unter Regulation der Genschalterbindestelle und (iii) die Sequenzen für die Selektionsmarker auf drei verschiedenen Nukleinsäuremolekülen liegen. Durch Transkription des Genschaltermoleküls im Zellkern kann das nach erfolgter Translation im Cytoplasma gebildete Genschalterprotein wiederum im Zellkern an die Genschalterbindestelle der Immunmodulatorsequenz binden und dessen Expression regulieren.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Vektor, der mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält.

Vektoren im Sinne der vorliegenden Erfindung können Plasmide, Shuttle-Vektoren, Phagemide, Cosmide, adenovirale Vektoren, retrovirale Vektoren, Expressionsvektoren und gentherapeutisch wirksame Vektoren sein.

Expressionsvektoren im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, mindestens ein Translations-Initiations-Signal, ein Translations-Terminations-Signal und/oder ein Polyadenylierungs-Signal zur Expression in Eukaryoten.



Derartige Expressionsvektoren, insbesondere zur Expression in Säugetierzellen, sind u.a. kommerziell erhältlich, beispielsweise pIRES (Fa. Clontech, Heidelberg), pCI-neo Vektor (Fa. Promega, Mannheim), pCMV-Script (Fa. Stratagene, La Jolla, USA) und pcDNA3 Vektor (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) oder können aus einzelnen Elementen individuell zusammengestellt werden.

Erfindungsgemäße gentherapeutisch wirksame Vektoren sind zum Beispiel Plasmidvektoren, Virusvektoren, beispielsweise Adenovirus-Vektoren, retrovirale Vektoren oder Vektoren, die auf Replikons von RNA Viren beruhen (siehe z.B. Lindemann et al., 1997, Mol. Med. 3: 466-76; Springer et al., 1998, Mol. Cell. 2: 549-58; Khromykh, 2000, Curr. Opin. Mol. Ther.; 2: 555-69).

Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, dass man die erfindungsgemäßen Nukleinsäure-Fragmente mit Liposomen komplexiert. Bei der Lipofektion werden kleine unilamellare Vesikel aus kationischen Lipiden durch Ultraschallbehandlung der Liposomensuspension hergestellt. Die DNA wird ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, dass eine positive Nettoladung verbleibt und die Plasmid-DNA zu 100% von den Liposomen komplexiert wird. Neben den Lipidmischungen DOTMA (1,2-dioleoyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid) und DPOE (dioleoylphosphatidylethanolamin) wurden inzwischen zahlreiche neue Lipidformulierungen synthetisiert und auf ihre Transfektionseffizienz bei verschiedenen Zelllinien getestet. (Behr et al. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6982-6986; Gao und Huang, 1991, Biochem. Biophys. Acta 1189, 195-203; Felgner et al. 1994, J. Biol. Chem. 269, 2550-2561). Beispiele der neuen Lipidformulierungen sind DOTAP N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethyl-ammoniummethyl-sulfat oder DOGS (TRANSFECTAM; diocta-decylamidoglycylspermin). Hilfsstoffe, die den Transport von Nukleinsäuren in die Zellen erhöhen, können beispielsweise Proteine oder Peptide, die an DNA gebunden sind oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle, die den Transport der Nukleinsäure in den Kern der Zelle ermöglichen, sein (Schwartz et al., 1999, Gene Therapy 6: 282; Branden et al. 1999, Nature Biotech. 17: 784). Hilfsstoffe umfassen auch Moleküle, die die Freisetzung von Nukleinsäuren in das Zytoplasma der Zelle ermöglichen (Planck et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, 12918; Kichler et al., 1997, Bioconj. Chem. 8, 213) oder beispielsweise Liposomen (Uhlmann und Peimann, 1990, Chem. Rev. 90, 544). Die erfindungsgemäßen Zellen können auch zur Expression eines heterologen Gens verwendet werden.

Gentherapeutische Vektoren können durch Transfektion (z.B. Elektroporation, Lipofektion, Calciumphosphatpräzipitation) oder Infektion in Zellen eingebracht werden.

Ferner ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Arzneimittel, welches mindestens eine erfindungsgemäße Zelle und geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe enthält.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann zur Prophylaxe und/oder Therapie von Erkrankungen dienen, beispielsweise von

- (a) rheumatischen Erkrankungen, beispielsweise rheumatische Arthritis, Sjögren's Syndrom, Skleroderma, Dermatomyositis, Polymyositis, Reiter's Syndrom oder Behcet's Krankheit,
- (b) Diabetes Typ I oder LADA
- (c) Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse, beispielsweise Graves' Krankheit,
- (d) Autoimmunerkrankungen des zentralen Nervensystems, beispielsweise Multiple Sklerose,
- (f) Hauterkrankungen, beispielsweise Psoriasis oder Neurodermitis,
- (g) entzündliche Darmerkrankungen, beispielsweise Ulcerative Colitis oder Morbus Crohn
- (h) Immunstörungserkrankungen
- (i) Gefäßerkrankungen und
- (j) Transplantationsfolgeerkrankungen, beispielsweise Transplantatabstoßungsreaktionen.

Geeignete Hilfs- und Zusatzstoffe, die z.B. der Stabilisierung und/oder Konservierung des Arzneimittels dienen, sind dem Fachmann allgemein geläufig. Hierzu zählen beispielsweise physiologische Kochsalzlösungen, Ringer-Dextrose, Ringer-Laktat, University of Wisconsin-Lösung/ViaSpan® (Belzer UW), EuroCollins Lösung, DMSO, Ethylenglykol, Sukrose, Trehalose, Ficoll, Perfluorokarbonate, entmineralisiertes Wasser, Stabilisatoren, Antioxidantien, Komplexbildner, antimikrobielle Verbindungen, Proteinaseinhibitoren und/oder inerte Gase.

Die Verabreichung des erfindungsgemäßen Arzneimittels erfolgt nach Methoden, die für den jeweiligen Zell-, Gewebs- bzw. Organtyp, dem sie verabreicht werden sollen, geeignet sind. Derartige Methoden sind dem Fachmann geläufig. Die Verabreichung des Arzneimittels kann danach beispielsweise

- für Leberzellen intravenös,
- für Herzmuskelzellen intramuskulär oder auch durch eine Katheter-basierte Verabreichung und
- für  $\beta$ -Zellen subkutan, intravenös, intraperitoneal, enkapsuliert oder intramuskulär erfolgen.

Das Arzneimittel kann in den Organismus eingebracht werden entweder mit Hilfe eines *ex vivo* Ansatzes, bei dem die Zellen aus dem Patienten entfernt, genetisch modifiziert, beispielsweise durch DNA-Transfektion, und danach erneut in den Patienten eingeführt werden oder mit Hilfe eines *in vivo*

Ansatzes, bei welchem erfindungsgemäße gentherapeutisch wirksame Vektoren in den Körper des Patienten als nackte DNA oder unter Verwendung von viralen oder nicht-viralen erfindungsgemäßen Vektoren oder erfindungsgemäßen Zellen eingebracht werden.

Es ist bekannt, dass die Dosierung von Arzneimitteln von mehreren Faktoren abhängt, beispielsweise von dem Körpergewicht, dem generellen Gesundheitszustand, dem Ausmaß der Körperoberfläche, dem Alter des Patienten sowie der Wechselwirkung mit anderen Medikamenten. Eine Dosierung hängt ebenfalls von der Art der Verabreichung ab. Die Dosierung ist daher im Einzelfall für jeden Patienten vom Fachmann zu bestimmen. Die Verabreichung des Arzneimittels kann einmal oder mehrmals am Tag und über mehrere Tage hinweg erfolgen; auch dies ist vom Fachmann bestimmbar.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder ein humanes oder tierisches Säugetierorgan, das mindestens eine erfindungsgemäße Zelle enthält.

Die Begriffe organspezifisches Gewebe und Säugetierorgan im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen beispielsweise die Säugetierorgane Herz, Haut, Bauchspeicheldrüse, Nieren, Leber, Muskeln, Nerven, Auge, Lunge, Knochenmark, Knorpel, Knochen, Gefäße, Bindegewebe, bzw. Gewebe dieser Organe.

Ferner ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein transgenes nicht-humanes Säugetier, das mindestens eine erfindungsgemäße Zelle enthält.

Transgene Tiere zeigen im allgemeinen eine gewebespezifisch erhöhte Expression von Nukleinsäuren und sind daher für die Analyse beispielsweise von Immunreaktionen sehr geeignet. Bevorzugt werden transgene Mäuse verwendet.

Ein erfindungsgemäßes nicht-humanes Säugetier ist beispielsweise eine Maus, eine Ratte, ein Meerschweinchen, ein Kaninchen, eine Kuh, ein Schaf, eine Ziege, ein Pferd, ein Schwein, ein Hund, eine Katze oder ein Affe.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen Zelle, eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans zur Transplantation in ein humanes oder tierisches Säugetier. Vorzugsweise handelt es sich bei der erfindungsgemäßen Transplantation um eine

#### Auto-, Allo- oder Xenotransplantation.

Unter Transplantation versteht der Fachmann die Übertragung oder auch Verpflanzung von lebendem Material, beispielsweise Zellen, Gewebe und Organe, an eine andere Stelle desselben Organismus (Autotransplantation) oder von einem Organismus (Spender) in einen anderen Organismus (Empfänger). Bei der Transplantation in einen anderen Organismus wird unterschieden zwischen

- Synotransplantation, bei der Spender und Empfänger derselben Spezies angehören und genetisch völlig oder weitgehend identisch sind,
- Allotransplantation, bei der Spender und Empfänger derselben Spezies angehören, aber immungenetisch different sind und
- Xenotransplantation, bei der Spender und Empfänger nicht derselben Spezies angehören und demzufolge immungenetisch völlig different sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen Zelle, eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans zur Inhibierung einer Transplantatabstoßungsreaktion in einem tierischen Säugetier oder im Menschen.

Unter einem tierischen Säugetier im Sinne der vorliegenden Erfindung ist beispielsweise eine Maus, eine Ratte, ein Meerschweinchen, ein Kaninchen, eine Kuh, ein Schaf, eine Ziege, ein Pferd, ein Schwein, ein Hund, eine Katze oder ein Affe zu verstehen.

Unter einer Transplantatabstoßungsreaktion versteht der Fachmann einen Vorgang, durch den transplantiertes Material, beispielsweise Zellen, Gewebe oder ein Organ, vom Empfängerorganismus abgestoßen wird. Diese Abstoßungsreaktion wird durch eine zelluläre und eine humorale Immunität hervorgerufen. Ursache dieser Abstoßungsreaktion ist eine Differenz der Eiweißstruktur zwischen transplantiertem Material und Empfänger. Die Eiweißstruktur des übertragenen Gewebes wird vom Immunsystem des Empfängers als immunogen erkannt, wodurch eine Immunantwort ausgelöst wird.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen Zelle, eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolgeerkrankungen und/oder Autoimmunerkrankungen. Beispiele für derartige Erkrankungen wurden bereits vorangehend im Rahmen der Anwendungsgebiete des erfindungsgemäßen Arzneimittels beschrieben.

Die erfindungsgemäßen Verwendungen zur Inhibierung einer Transplantatabstoßungsreaktion sowie zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolgeerkrankungen und/oder Autoimmunerkrankungen können beispielsweise erfolgen, indem die erfindungsgemäßen Zellen, Gewebe und/oder Organe in ein humanes oder tierisches Säugetier eingebracht werden. Die Expression des erfindungsgemäßen Immunmodulators wird über das erfindungsgemäße regulierbare Genexpressionssystem gesteuert. Diese Steuerung erfolgt durch die Verabreichung bzw. das Absetzen einer erfindungsgemäßen Wirksubstanz, wodurch das Genschaltermolekül aktiviert bzw. deaktiviert wird. Im Fall der Aktivierung aktiviert der Genschalter die Transkription des Zielgens, welches für den Immunmodulator kodiert. Der dadurch exprimierte Immunmodulator inhibiert im wesentlichen eine Abwehrreaktion des Immunsystems auf die/das transplantierte Zelle, Gewebe bzw. Organ und zwar vor allem in der Transplantatregion des Organismus des humanen oder tierischen Säugetiers.

Eine Behandlung basierend auf der Verwendung von Zellen kann dadurch erreicht werden, dass erfindungsgemäße Zellen aus Epithelzellen, Endothelzellen, Leberzellen, Derivaten von nicht-totipotenten embryonalen Stammzellen bzw. nicht-totipotenten embryonalen Keimzellen, oder aus adultem Gewebe stammenden Stammzellen ausgewählt werden. Bevorzugte, aus adultem Gewebe stammende Stammzellen umfassen neuronale Stammzellen, Stammzellen aus dem Knochenmark, mesenchymale Stammzellen, hämatopoetische Stammzellen, epitheliale Stammzellen, Stammzellen aus dem Verdauungstrakt, der Haut, dem Fettgewebe, dem Darm, der Plazenta und dem Duktus des Pankreas, die in ein humanes oder tierisches Säugetier eingebracht werden.

Ferner ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Zelle, wobei das Verfahren die folgenden Schritte enthält:

- a. Einbringen mindestens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder mindestens eines erfindungsgemäßen Vektors in eine transplantierbare humane oder tierische nicht-totipotente Zelle, und
- b. Expression der Nukleinsäure unter Zugabe mindestens einer geeigneten Wirksubstanz zur Regulierung des Genschaltermoleküls.

Zum Einbringen einer Nukleinsäure, eines Vektors, eines Differenzierungs-Markergens oder eines Transfektions-Markergens oder einer Zelle gemäß vorliegender Erfindung in eine Zelle werden die dem Fachmann geläufigen Standardmethoden der Transfektion, Transformation, Elektroporation oder Injektion verwendet.

Geeignete Bedingungen, die eine Expression der Nukleinsäure bewirken bzw. verstärken, wurden bereits vorangehend beschrieben. Hierzu zählen beispielsweise Expressionsvektoren, Promotoren und regulierbare Nukleinsäuresequenzen, z.B. Enhancer, Polyadenylierungssequenzen.

Ferner ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein *in vitro*-Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans, wobei das Verfahren die folgenden Schritte enthält:

- a. Einbringen sowohl mindestens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder mindestens eines erfindungsgemäßen Vektors als auch mindestens eines Differenzierungs-Markergens in mindestens eine nicht-totipotente Stammzelle, eine nicht-totipotente Vorläuferzelle und/oder eine nicht-totipotente immortalisierte Zelle,
- b. Differenzierung der Zelle aus Schritt a.,
- c. Selektionieren der differenzierten Zelle aus Schritt b. und
- d. Einbringen der selektierten Zelle aus Schritt c. in ein humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder in ein humanes oder tierisches Säugetierorgan.

Bevorzugt wird in einer weiteren Ausführungsform in das genannte erfindungsgemäße *in vitro*-Verfahren nach, vor oder gleichzeitig mit Schritt a. mindestens ein geeignetes Transfektions-Markergen in eine nicht-totipotente Stammzelle, eine nicht-totipotente Vorläuferzelle und/oder eine nicht-totipotente immortalisierte Zelle eingebracht und nach Schritt a. vorzugsweise die transfizierte Zelle aus Schritt a. selektioniert.

Die Differenzierung der Zellen, die die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten, kann z.B. durch "Embroid Body Formation", vorzugsweise durch Kultivieren der Zellen in Lösungen, durch Kultivieren der Zellen in hoher Dichte, durch Zellaggregation, durch Entzug der Kultivierung auf Feederzellen, Entzug von differenzierungshemmenden Substanzen (z.B. LIF oder von Feederzellen konditioniertes Medium), durch Hinzufügen von Cytokinen, Wachstumsfaktoren, Hormonen, Vitaminen (z.B. Nicotinamid), Retinsäure, Natriumbutyrat oder DMSO zu den kultivierten Zellen oder durch Hinzufügen anderer Substanzen von denen bekannt ist, dass sie die Differenzierung initiieren, eingeleitet werden.

Es sind zahlreiche Verfahren zur Selektionierung von Zellen bekannt.

Verfahren zur Selektionierung von Zellen aus differenzierten embryonalen Stammzellen sind

beispielsweise beschrieben in Klug et al. (J. Clin. Invest. 1996 Jul 1; 98 (1):216-24) und Soria et al. (Diabetes. 2000 Feb.; 49 (2): 157-62).

Bei einer bevorzugten Methode der Selektion enthält die erfindungsgemäße Selektionskassette ein Markergen, und zwar ein Antibiotikum-Resistenzgen. Die Zellen werden selektiert bzw. isoliert, indem die differenzierten Zellen nach Hinzufügen eines geeigneten Antibiotikums während oder nach dem Differenzierungsschritt angereichert werden. Nur die differenzierten Zellen, welche das Markergen exprimieren, sind resistent gegen das Antibiotikum. Nicht differenzierte Zellen sterben ab. Nach der gleichen Methode kann auch die Selektion der transfizierten Zellen erfolgen.

Unter einem erfindungsgemäßen Antibiotikum wird ein Antibiotikum verstanden, gegen welches das bzw. die als erfindungsgemäße Selektionskassette verwendete(n) Antibiotikum-Resistenzgen(e) eine Resistenz erzeugt/en. Nach Hinzufügen des Antibiotikums zu den kultivierten Stammzellen überleben und differenzieren im wesentlichen nur solche Stammzellen, die den Reporter-Gen-Expressionsvektor enthalten.

Ebenfalls kann ein Selektionsverfahren angewendet werden, wobei das bzw. die Gene der erfindungsgemäßen Selektionskassette kodieren für Luciferase, grünes fluoreszierendes Protein, rotes fluoreszierendes Protein und/oder gelbes fluoreszierendes Protein. Die zu selektierenden Zellen werden mittels Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierung (FACS) isoliert oder durch eine Affinitätsreinigung selektiert.

Weiterhin können Zellen mit Hilfe von Oberflächenmolekülen, z.B. Wachstumsfaktor-Rezeptoren, mittels magnetischen Immunobeads ankonzentriert werden (Bonini C., Science Vol 276, 1719-1724, 1997).

Vorzugsweise kann ein zweites Markergen in die Zellen eingebracht werden, wodurch eine Selektion der Zellen, in denen das Einbringen der Nukleinsäure und/oder des Vektors gemäß Schritt a. des erfindungsgemäßen *in vitro*-Verfahrens erfolgreich verlief, vorgenommen werden kann. Durch diese doppelte Selektion ist es möglich, eine ca. 90%ig, vorzugsweise ca. 95-100%ig reine Zellpopulation der gewünschten Zellen zu erhalten.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers, wobei das Verfahren die folgenden Schritte enthält:

- a. Einbringen sowohl mindestens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder mindestens eines erfindungsgemäßen Vektors als auch mindestens eines geeigneten Transfektions-Markergens in mindestens eine Oocyte, Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle eines nicht-humanen Säugetieres,
- b. Selektionieren der transfizierten Zelle aus Schritt a.,
- c. Einbringen der nach Schritt b. selektierten Zelle in mindestens eine nicht-humane Säugetier-Blastozyste,
- d. Einbringen der Blastozyste aus Schritt c. oder des Embryos aus Schritt d. in eine nicht-humane Säugetier-Pflegemutter und
- e. Identifizierung des sich aus genannter Blastozyte entwickelten transgenen nicht-humanen Säugetiers.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers, wobei das Verfahren die folgenden Schritte enthält:

- a. Einbringen sowohl mindestens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder mindestens eines erfindungsgemäßen Vektors als auch mindestens eines geeigneten Transfektions-Markergens in einen der beiden Vorkerne einer befruchteten nicht-humanen Säugetier-Oocyte,
- b. Einbringen der Säugetier-Oocyte aus Schritt a. in eine nicht-humane Säugetier-Pflegemutter und
- c. Identifizierung des sich aus genannter Säugetier-Oocyte entwickelten transgenen nicht-humanen Säugetiers.

Es ist bevorzugt, dass die nicht-humane Säugetier-Pflegemutter durch Paarung mit einem Männchen mit durchtrenntem Samenleiter scheinschwanger gemacht wurde.

Verfahren zum Einbringen von Blastozyten und/oder Oozyten in die Pflegemutter sind dem Fachmann bekannt. Es kann beispielsweise durch Injektion in den Eileiter oder Uterus erfolgen (siehe z.B. Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F. und Lacy, E., A laboratory Manual (1994), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Seite 173-181).

Die Identifizierung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers kann beispielsweise dadurch erfolgen,



dass genomische DNA aus dem transgenen nicht-humanen Säugetier, z.B. aus dem Schwanz einer Maus extrahiert wird. In einer nachfolgenden PCR (Polymerase Ketten Reaktion) Analyse werden Primer verwendet, die spezifisch das Transgen für die erfindungsgemäße Nukleinsäure erkennen. Eine Integration des Transgens in das Genom kann auf diese Weise nachgewiesen werden.

Eine weitere Möglichkeit der Identifizierung kann mittels Southern Blot erfolgen. Hierbei wird genomische DNA auf eine Membran übertragen und mittels DNA-Sonden, beispielsweise radioaktiv markierte DNA-Sonden, die spezifisch für das gesuchte Transgen sind, detektiert.

Verfahren zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers durch Regenerieren einer nicht-humanen Stammzelle, Oocyte, Vorläuferzelle oder immortalisierten Zelle zu einem transgenen nicht-humanen Tier, insbesondere von transgenen Mäusen sind dem Fachmann beispielsweise aus DE 196 25 049 und US 4,736,866; US 5,625,122; US 5,698,765; US 5,583,278 und US 5,750,825 bekannt und umfassen transgene Tiere, die beispielsweise durch direkte Injektion von erfindungsgemäßen Expressionsvektoren in Embryonen oder Spermatozyten oder über die Transfektion von Expressionsvektoren in embryonale Stammzellen erzeugt werden können (siehe z.B. Polites und Pinkert: DNA Mikroinjection and Transgenic Animal Production, Seite 15-68 in Pinkert, 1994: Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, Academic Press, London, UK; Houdebine 1997, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands; Doetschman: Gene Transfer in Embryonic Stem Cells, Seite 115-146 in Pinkert, 1994, *supra*; Wood: Retrovirus-Mediated Gene Transfer, Seite 147-176 in Pinkert, 1994, *supra*; Monastersky: Gene Transfer Technology: Alternative Techniques and Applications, Seite 177-220 in Pinkert, 1994, *supra*).

Zahlreiche Verfahren zur Herstellung von transgenen Tieren, insbesondere von transgenen Mäusen, sind dem Fachmann ebenfalls u.a. aus der WO 98/36052, WO 01/32855, DE 196 25 049, US 4,736,866, US 5,625,122, US 5,698,765, US 5,583,278 und US 5,750,825 bekannt und umfassen transgene Tiere, die beispielsweise über direkte Injektion von erfindungsgemäßen Vektoren in Embryonen oder Spermatozyten oder über die Transfektion von Vektoren oder Nukleinsäuren in embryonale Stammzellen erzeugt werden können (siehe auch Polites und Pinkert, in Pinkert, (1994) Transgenic animal technology, A Laboratory Handbook, Academic Press, London, UK, Seite 15 bis 68; Doetschman, in Pinkert, 1994, *supra*, Seite 115 bis 146).

In weiteren Ausführungsformen handelt es sich bei der Stammzelle, welche in den genannten erfindungsgemäßen *in vitro*-Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen humanen oder

tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans und in den Verfahren zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers verwendet wird, um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle.

Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein transgenes nicht-humanes Säugetier, welches durch das oben beschriebene erfindungsgemäße Verfahren erzeugt wurde, sowie der/die Nachkomme(n) dieses Säugetiers.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers zur Gewinnung einer humanen oder tierischen Zelle, eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans für die Allo- und/oder Xenotransplantation.

Im Fall der Zelltransplantation kann diese beispielsweise mittels eines Implantations-Verfahrens oder mittels einer Katheter-Injektionsmethode durch die Blutgefäßwand erfolgen.

Unter Gewinnung im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die Entnahme der/des genannten Zelle, Gewebes und/oder Organs aus dem Organismus eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers zu verstehen. Methoden für eine solche Entnahme sind geläufig.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers, einer erfindungsgemäßen Zelle, eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans zum Auffinden von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen und/oder zur Identifizierung von toxischen Substanzen.

Eine solche Methode könnte zum Beispiel darin bestehen, Zellen der vorliegenden Erfindung auf z.B. eine 96-well Mikrotiter-Platte auszusäen, dann eine zu untersuchende pharmakologisch aktive oder toxische Substanz zuzugeben und anschließend mittels Zellzahlbestimmung zu analysieren, ob die Substanz den Tod einer vermehrten Anzahl von Zellen bewirkt hat.

Unter den Begriffen pharmakologisch aktiver Wirkstoff und toxische Substanz im Sinne der Erfindung sind all jene Moleküle, Verbindungen und/oder Zusammensetzungen und Substanzgemische zu verstehen, die unter geeigneten Bedingungen einen pharmakologischen bzw. toxischen Einfluss auf

einzelne Zellen, einzelne Gewebe, einzelne Organe oder den gesamten Organismus eines tierischen oder humanen Säugetiers ausüben. Mögliche pharmakologisch aktive Wirkstoffe und toxische Substanzen können einfache chemische (organische oder anorganische) Moleküle oder Verbindungen, Nukleinsäuren oder Analoga von Nukleinsäuren, anti-sense Sequenzen von Nukleinsäuren, Peptide, Proteine oder Komplexe und Antikörper sein. Beispiele sind organische Moleküle, die aus Substanz-Bibliotheken stammen und die auf ihre pharmakologische bzw. toxische Aktivität hin untersucht werden.

Pharmakologisch aktive Wirkstoffe sind beispielsweise Wirkstoffe, die Einfluss ausüben auf:

- die Teilungs- und/oder Überlebensfähigkeit von Zellen,
- die Sekretion von Proteinen, z.B. Insulin von Beta-Zellen des Pankreas, Dopamin von Nervenzellen,
- die Muskelzellen-Kontraktion und/oder
- das Wanderungsverhalten von Zellen,
- die Stoffwechselaktivität von Zellen
- die elektrophysiologische Aktivität von Zellen
- die enzymatische Aktivität von Zellprodukten
- die Zelldifferenzierung
- die Zellorganisation zu Geweben bzw Organen

In Anwendung auf den gesamten Organismus eines tierischen oder humanen Säugetiers ist hierunter ein Einfluss auf beispielsweise

- das Herz-Kreislaufsystem,
- das endokrine System,
- das Magen-Darm-System,
- das Nervensystem sowie
- die Stoffwechselaktivitäten

zu verstehen.

Toxische Substanzen sind beispielsweise Wirkstoffe, die

- Zellen nach bestimmten Signalen, beispielsweise Stress, zur Apoptose anregen,
- das Herz-Kreislaufsystem beeinflussen,
- das Nervensystem beeinflussen und/oder
- die Stoffwechselaktivitäten beeinflussen.

Die identifizierten pharmakologisch aktiven Wirkstoffe und toxischen Substanzen können

gegebenenfalls kombiniert oder zusammen mit geeigneten Zusatz- und/oder Hilfsstoffen zur Herstellung eines Diagnostikums oder eines Arzneimittels zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolgeerkrankungen und/oder Autoimmunerkrankungen, wie vorangehend beispielhaft aufgeführt, verwendet werden.

## Abbildungen

Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die vorliegende Erfindung verdeutlichen ohne sie jedoch zu beschränken:

### Abb. 1

zeigt eine Immunoblotanalyse von Medienüberständen der Transfektion 17x4/IL15/Oligo + pcDNA3switch +/- Mifepriston (Beispiel 3);

### Abb. 2

zeigt eine schematische Abbildung des Wirkmechanismus des erfindungsgemäßen durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbaren Genexpressionssystems.

Der Genschalter der vorliegenden Erfindung ist ein chimäres Protein, das aus drei funktionellen Einheiten besteht:

- i) eine Gal4-DNA-Bindungsdomäne (Gal-DBD), welche die Genschalterbindungsdomäne UAS erkennt. Die UAS-Sequenz der Erfindung enthält vier Kopien eines Sequenzmotivs aus 17 Nukleotiden, von denen jedes Motiv als Bindungsstelle für zwei Gal4-DBD Moleküle dienen kann.
- ii) Eine verkürzte Ligandenbindungsdomäne des menschlichen Progesteron-Rezeptors (PR-LBD), welche die Bindung der Wirksubstanz Mifepriston an den Genschalter vermittelt und die Konversion des Genschalterproteins in eine aktive Konformation durch Dimerisierung bewirkt.
- iii) Eine p65 Aktivierungsdomäne (P65-AD), welche die Transkription des Zielgens durch den Genschalter aktiviert.

Bei Abwesenheit von Mifepriston wird der Genschalter durch den vorgeschalteten ubiquitären schwachen basalen minimalen Thymidinkinase Promoter (pTK) in geringem Mengen transkribiert. Diese Genschaltermoleküle liegen aber als Monomere vor und können damit noch keine

DNA-Bereiche binden oder die Transkription initiieren. Nach Zugabe der Wirksubstanz Mifepriston erfolgt die Aktivierung des Genschaltersystems. Das Liganden-gebundene Genschalter-Homodimer bindet an alle Bereiche der DNA, die UAS-Sequenzen enthalten (wie z.B. die regulatorische Region vor dem durch den TATA-Promoter regulierten Gen für MutIL15-mFc) und aktiviert somit die Transkription des immunomodulatorischen Proteins. Da dem TK-Promoter des Genschalterproteingens zusätzlich DNA-Bereiche mit UAS-Sequenzen vorgeschaltet sind, wird gleichzeitig in einem autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus die Transkription des Genschalterproteins selbst aktiviert und somit die Menge des aktiven Genschalters erhöht. Weiterhin können die aus Zelllinien hergestellten transplantierbaren Zellen der Erfindung Markergene wie z.B. für Resistenzen gegen die Antibiotika Neomycin (Neo-R) bzw. Hygromycin (Hygro-R) enthalten. Die Markergene, welche von einem ubiquitären Promoter wie z.B. dem Phosphoglyceratkinase-Promoter (pGK) reguliert werden, dienen der Selektion der Zelle auf Aufnahme des DNA-Konstruktes. Die durch einen zelltypspezifischen Promoter, wie z.B. den Ratten-Insulinpromoter RIP) kontrollierten Markergene dienen der Selektion von transgenen Zellen eines spezifischen Zelltyps. Zur Generierung der transgenen Tiere der Erfindung müssen die Zellen mindestens die Elemente 1 und 2 enthalten. Zur Herstellung der transgenen Zellen aus Zelllinien können die Zellen noch zusätzlich Element 3 enthalten.

## Beispiele

Zur Untersuchung und Demonstration der Wirkungsweise der regulierten Expression des immunmodulierenden Proteins MutIL-15/mFc wurden zwei experimentelle Modelle entwickelt:

### a) Transgene Zelllinie zur Transplantation

Bei diesem Modell wurden Stammzellen mit Vektor-Konstrukten transfiziert, die zusätzlich zu den Elementen für die regulierbare Expression des Immunmodulators MutIL-15/mFc eine Selektionskassette enthielten, die die Herstellung eines spezifischen Zelltyps (z.B. Insulin-produzierende Zelle) ermöglichte (siehe US 5,733,727). Auf diese Weise können aus undifferenzierten transgenen Stammzellen differenzierte Zellen eines spezifischen Zelltyps hergestellt und isoliert werden. Diese transgenen differenzierten Zellen können in eine geeignete Empfängermaus (z.B. diabetische Maus) transplantiert werden. Werden die transplantierten Tiere mit Mifepriston behandelt, bilden die transplantierten Zellen selbst MutIL-15/mFc und verhindern damit ihre eigene Abstoßung.

#### b) Transgenes Mausmodell

Es wurden transgene Mäuse generiert, die im Genom ein Konstrukt enthalten, das die regulierte Expression von MutIL-15/mFc durch Zugabe von Mifepriston bewirkt. Da die Expression von MutIL-15/mFc durch einen ubiquitären Promoter reguliert wird, produzierten die Mäuse MutIL-15/mFc, wenn sie durch Zugabe von Mifepriston stimuliert werden. Aus den transgenen Tieren können Organe (z.B. Herz, Niere) oder Zellen (Inselzellen, neuronale Zellen) entnommen und in eine andere nicht-transgene Maus transplantiert werden. Werden die transplantierten Tiere mit Mifepriston behandelt, bildet das transplantierte Organ/Zellen selbst MutIL-15/mFc und verhindert damit seine eigene Abstoßung.

#### Beispiel 1: Vektorklonierung für ein transgenes Mausmodell

In dem Vektor 17x4/pGL3 Basic (modifizierter pGL3Basic Vektor von Promega mit TATA Box und 4 Kopien des 17-Oligomers als Genschalterbindungsstelle) wurde das Luciferase-Gen durch das Gen für ein Fusionsprotein aus mutiertem IL-15 Protein und Maus FcTeil ( im weiteren bezeichnet als MutIL-15/mFc: Kim et al., The Journal of Immunology, 1998, 160: 5742-5748), das zusätzlich eine CD5 Leadersequenz enthält (Jones H., Nature 323 (6086), 346-349, 1986), ersetzt. Dadurch wird das CD5-MutIL-15/mFc Gen durch eine SV40polyA Sequenz abgeschlossen (Vektornamen 17x4/IL15). Anschliessend wurde vor den 17-Oligomeren ein Oligonukleotid mit den Schnittstellen SbfI und PmeI eingeführt (Vektornamen 17x4/IL15/Oligo). Diese Schnittstellen dienten zum Einfügen des Gens für das Genschaltermolekül (GS = Gal4-DBD/hPR-LBD/p65-AD) inklusive vorgeschalteter regulatorischer Region (Gal4UAS-PTK-IVS8), welche aus dem Vektor pswitch (Invitrogen, Karlsruhe) isoliert wurden (Vektornamen 17x4/IL15/Oligo/GS). Zusätzlich wurde alternativ ein Vektor hergestellt, in den zwischen TATA Box und Startcodon des CD5- MutIL-15/mFc Gens das Intron IVS8 (ebenfalls aus pswitch) eingesetzt wurde (Vektornamen 17x4/IL15/Oligo/IVS8/GS). Die Übergänge zwischen den Segmenten aller Klonierungsprodukte wurden durch Sequenzierungen überprüft.

#### Beispiel 2: Vektorklonierung für transgene in vitro Transplantate aus Insulin-produzierenden Zellen

Diese Vektoren wurden analog zu den Vektoren für das transgene Mausmodell hergestellt. Zusätzlich enthalten diese Plasmide jedoch noch ein Fragment, welches ein vom Ratten-Insulinpromoter (RIP) reguliertes Neomycin-Resistenzgen (neo) sowie ein vom Maus-Phosphoglyceratkinase-Promoter (pGK) reguliertes Hygromycin-Resistenzgen (hygro) enthält. Diese Elemente wurden 5' unterhalb des CD5- MutIL-15/mFc Gens eingefügt und alternativ in zwei Transkriptionsrichtungen kloniert (Vektornamen 17x4/IL15/Oligo/RIPnh/GS und 17x4/IL15/Oligo/RIPnh/GS). Zusätzlich wurden alternativ Vektoren hergestellt, in denen zwischen TATA Box und Startcodon des CD5-mutIL15-mFc

Gens das Intron IVS8 (ebenfalls aus pswitch) eingesetzt wurde (Vektornamen 17x4/IL15/Oligo/RIPh/TVS8/GS sowie 17x4/IL15/Oligo/RIPnh/TVS8/GS). Die Übergänge zwischen den Segmenten aller Klonierungsprodukte wurden durch Sequenzierungen überprüft.

Beispiel 3: Überprüfung der regulierten Expression und Sekretion von CD5-mutIL15-mFc in den in Beispiel 1 und 2 genannten Vektoren

Es wurden transiente Transfektionen von cos-7 Zellen (DSMZ, Braunschweig) und A293 Zellen (Quantum, Montreal, Canada) durchgeführt. Dazu wurden am Tag vor der Transfektion  $5-7,5 \times 10^5$  Zellen/Loch auf 6-Loch Platten ausgesät. Für die Transfektion, die mit 1-2  $\mu\text{g}$  DNA/Loch durchgeführt wurde, wurden je 10-20  $\mu\text{l}$  DNA der Konzentration 10 ng/ml mit je 250  $\mu\text{l}$  OptiMEM-I Medium (Life Technologies, Karlsruhe) gemischt. Parallel dazu wurden je 2  $\mu\text{l}$  Lipofectamin 2000 (Life Technologies, Karlsruhe # 11668-019) /  $\mu\text{g}$  DNA mit 250  $\mu\text{l}$  OptiMEM-I Medium (Life Technologies, Karlsruhe # 31985-062) gemischt. Gleiche Volumina beider Ansätze wurden gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. In der Zwischenzeit wurden die 6-Loch Platten mit den 50-70 % konfluenten Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend je 1,5 ml Wachstumsmedium/Loch (DMEM + 10 % FCS) zugegeben. Zu diesen Zellen wurden pro Loch je 500  $\mu\text{l}$  des DNA/Lipofectamingemisches tropfenweise hinzugefügt. Zellen, die mit Mifepriston stimuliert wurden, erhielten zusätzlich je 2  $\mu\text{l}$  einer  $10^{-5}$  M Lösung von Mifepriston (Sigma, Deisenhofen; Endkonzentration  $10^{-8}$  M) in 80 % Ethanol (Invitrogen, Karlsruhe). Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und 2 ml frisches Medium (DMEM + 10 % FCS) zugegeben. Die mit Mifepriston stimulierten Zellen erhielten dabei erneut zusätzlich je 2  $\mu\text{l}$  Mifepriston. 3 Tage nach der Transfektion wurde das Medium von den Zellen abgenommen, zur Entfernung von Zellresten zentrifugiert und anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  weggefroren. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, in PBS abgeschabt, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und für 30-60 min bei  $4^\circ\text{C}$  mit je 50  $\mu\text{l}$  RIPA-Puffer (PBS mit 1 % IGEPAL/Sigma, Deisenhofen I-3021, 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1 % SDS, 4mM EDTA und Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail/ Roche, Mannheim #1873580) lysiert. Die zentrifugierten Lysate wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Sekretion von CD5-mutIL15-mFc wurde mit Hilfe eines ELISA, der den Maus-Fc Teil des Fusionsproteins erkennt, analysiert. Dafür wurden 96-Loch Platten (Nunc, Wiesbaden # 439454) mit je 100  $\mu\text{l}$  eines anti-Maus IgG2a Antikörpers (Klon R11-89, BD PharMingen, Heidelberg # 02251D-553446) für eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  beschichtet. Anschließend wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen und für eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  mit DMEM+10%FCS inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Auf die beschichteten Platten wurden je 100  $\mu\text{l}$  unverdünnte Mediumüberstände gegeben, diese für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und danach 5x mit je 200  $\mu\text{l}$

PBS/0,1% Tween20 und 1x mit je 200 µl PBS gewaschen. Der enzymgekoppelte Antikörper HRP anti-Maus IgG 2a Klon R19-15 (BD PharMingen, Heidelberg # 02017E-553391) wurde zur Detektion des Maus-Fc Teils ebenfalls wieder für 1 h bei Raumtemperatur mit den Platten inkubiert und die Platten anschließend erneut wie oben beschrieben gewaschen. Die gebundene Menge des Fusionsproteins wurde durch eine Farbreaktion nach Zugabe einer OPD-haltigen Substratlösung (25 ml 0,1 M Zitronensäure, 25 ml 0,1 M Dikaliumhydrogenphosphat, ad 100 ml mit H<sub>2</sub>O + 1 Tablette OPD (Sigma Deisenhofen #P8412) + 40 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) sichtbar gemacht, durch Zugabe von 3 M HCl abgestoppt und anschließend in einem ELISA-Reader (µQuant, BIO-TEK Instruments Inc.) bei 490 nm gemessen.

Des Weiteren wurden unverdünnte Medienüberstände im Immunoblot analysiert. Dazu wurden Medienüberstände mit Lämmli-Probenpuffer gemischt, für 5 Minuten bei 92 °C erhitzt, anschließend auf ein 12,5 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 150 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher u. Schuell, Dassel CD0564-1) übertragen. Die Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungen mit 5 % Milchpulver/PBS/0,1% Tween20 behandelt. Danach wurde sie für 16 Stunden bei 4°C mit einer 1:500 Verdünnung von Maus-anti-humanem IL15 Antikörper (Becton-Dickinson, Heidelberg #554712) inkubiert, ausgiebig mit PBS/0,1% Tween20 gewaschen und danach für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer 1:3000 Verdünnung eines Peroxidase-gekoppelten Schaf-anti-Maus Antikörpers (Amersham, Freiburg #NA9310) behandelt. Die Membran wurde nach ausgiebigem Waschen für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit Detektionsreagenz (NEN; Bad Homburg #NE103E) behandelt und die Farbreaktion durch Auflegen eines Röntgenfilmes detektiert. Die Analysen von Medienüberständen von transfizierten Zellen mit bzw. ohne Mifepriston-Zugabe zeigten folgendes Ergebnis:

Folgende Transfektionen wurden durchgeführt :

1. mCD5.6 (Positivkontrolle für MutIL-15/mFcsekretion, Vektor mit CD5- MutIL-15/mFc unter der Kontrolle eines CMV-Promoters)
2. 17x4/IL15/Oligo +/- Mifepriston (Negativkontrolle ohne Genschalter)
3. 17x4/IL15/Oligo + pcDNA3switch +/- Mifepriston
4. 17x4/IL15/Oligo/GS +/- Mifepriston
5. 17x4/IL15/Oligo/GS + pcDNA3switch +/- Mifepriston
6. 17x4/IL15/Oligo/IVS8/GS +/- Mifepriston
7. 17x4/IL15/Oligo/IVS8/GS + pcDNA3switch +/- Mifepriston

Keine signifikante Expression von MutIL-15/mFc wurde in Zellen beobachtet, die mit dem



Kontrollvektor ohne Genschaltermolekül (2.) transfiziert worden waren sowie in Zellen, die nicht mit Mifepriston stimuliert worden waren. Nach Transfektion mit Konstrukten, die lediglich das autoregulierten Genschaltermolekül enthielten (4.+6.), konnte mit Hilfe des ELISA nur eine geringe Erhöhung der Sekretion von MutIL-15/mFc nach Mifepriston-Stimulation nachgewiesen werden. Dies beruhte vermutlich auf einer unzureichenden Bildung von aktiven Genschaltermolekülen durch autoregulatorische Genaktivierung im Verlauf der transienten Transfektion. Daher wurde die Genschaltermenge extern durch Kotransfektion mit dem Vektor pcDNA3switch (Genschalter unter Kontrolle des CMV-Promoters) erhöht, der eine konstant hohe Produktion an Genschalter bewirkt. In diesen Kotransfektionen enthielt der Medienüberstand von Zellen, die sowohl mit Genschalter-freien (3.) als auch enthaltenden Konstrukten (5.+7.) transfiziert worden waren, nach Mifepriston-Behandlung eine erhöhte Menge an MutIL-15/mFc, die durch ELISA nachgewiesen wurde.

Tabelle 1: Messung von MutIL-15/mFc in Medienüberständen von transient transfizierten A293 Zellen (Mittel von Doppelwerten)

	Konstrukt	pcDNA3switch	Mifepriston	M 490 Corr.
1	mCD5.6	-	-	1.750
2	17x4/II15/Oligo	-	+	0.006
3	17x4/II15/Oligo	+	-	< 0.000
	17x4/II15/Oligo	+	+	0.067
4	17x4/II15/Oligo/GS	-	-	< 0.000
	17x4/II15/Oligo/GS	-	+	0.006
5	17x4/II15/Oligo/GS	+	-	0.004
	17x4/II15/Oligo/GS	+	+	0.019
6	17x4/II15/Oligo/IVS8/GS	-	-	0.006
	17x4/II15/Oligo/IVS8/GS	-	+	0.009
7	17x4/II15/Oligo/IVS8/GS	+	-	0.010
	17x4/II15/Oligo/IVS8/GS	+	+	0.022

Immunoblotanalysen von Medienüberständen der Transfektion 3. (Abb. 1) bestätigen ebenfalls, dass eine erhöhte Menge an MutIL-15/mFc (50 kDa Bande) nach Mifepriston-Stimulierung (Spur 1) im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Spur 2) produziert wird.

Diese Ergebnisse beweisen, dass die Transkription und Sekretion von MutIL-15/mFc Fusionsprotein durch Mifepriston-Zugabe in Zellen induziert werden kann, die mit den oben vorgestellten Vektoren (z.B. 17x4/IL15/Oligo/TVS8/GS) transfiziert worden waren. Damit wurde die Funktionalität der regulierten Expression von MutIL-15/mFc bewiesen.

Beispiel 4: Überprüfung der regulierten Expression und Funktionalität des Genschalterproteins (Gal4UAS-PTK-IVS8-Gal4-DBD/hPR-LBD/p65-AD) in den in Beispiel 1 und 2 genannten Vektoren

Wie zuvor erwähnt war die Anzahl an aktiven Genschaltermolekülen, die in transient transfizierten Zellen, die nur autoregulierten Genschalter produzierten (Transfektion mit 17x4/IL15/Oligo/GS und 17x4/IL15/Oligo/TVS8/GS), gering.

Da der ELISA nicht sensitiv genug ist, um eine Expression von MutIL-15/mFc auf Einzelzellebene zu detektieren, wurden Kotransfektionen mit dem Plasmid pGene/V5-His/lacZ (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Dieser Vektor enthält ein lacZ Gen, dessen Transkription ebenfalls durch Genschalterbindungsstellen reguliert wird. Dies bedeutet, dass nur in solchen Zellen  $\beta$ -Galaktosidase produziert wird, in denen gleichzeitig durch Mifepriston-Stimulierung aktiver Genschalter enthalten ist. Der Genschalter wurde durch einen zweiten Vektor (in diesem Fall die Konstrukte mit autoreguliertem Genschalter) zur Verfügung gestellt.  $\beta$ -Galaktosidase konnte durch eine Substratreaktion als blauer Niederschlag in einzelnen Zellen detektiert werden. Dadurch konnte eine Funktion der Vektorkonstrukte mit wesentlich höherer Sensitivität nachgewiesen werden. A293 Zellen wurden wie im Beispiel 3 beschrieben mit folgenden Konstrukten transfiziert und anschließend teilweise mit Mifepriston stimuliert:

1. pCMV $\beta$  (Positivkontrolle für lacZ, Vektor mit lacZ-Gen unter der Kontrolle eines CMV-Promoters)
2. 17x4/IL15/Oligo + pGene/V5-His/lacZ +/- Mifepriston (Negativkontrolle ohne Genschalter)
3. 17x4/IL15/Oligo/GS + pGene/V5-His/lacZ +/- Mifepriston
4. 17x4/IL15/Oligo/TVS8/GS + pGene/V5-His/lacZ +/- Mifepriston
5. pcDNA3switch + pGene/V5-His/lacZ +/- Mifepriston (Positivkontrolle mit konstitutiv hohem Genschalter)
6. pGene/V5-His/lacZ –Mifepriston (Negativkontrolle ohne Genschalter)

Die Zellen wurden am dritten Tag nach der Transfektion für 10 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mit eiskaltem Methanol fixiert, 3x mit PBS gewaschen und anschließend für 2,5 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  mit lacZ Färbelösung (60  $\mu\text{l}$  von 400 mM Kaliumferricyanid, 60  $\mu\text{l}$  von 400 mM Kaliumferrocyanid, 60  $\mu\text{l}$  von 200 mM  $\text{MgCl}_2$ , 300  $\mu\text{l}$  20mg/ml X-Gal, 5,52 ml PBS) behandelt.

Die lichtmikroskopische Auswertung der transfizierten Zellen lieferte folgendes Ergebnis (Tab. 2):

**Tabelle 2: Intensität der  $\beta$ -Galaktosidasefärbung von transient transfizierten A293 Zellen**

	Konstrukt	Kotransfektion mit pGene/V5-His/lacZ	Mifepriston-Zugabe	Ergebnis
1	pCMVB	-	-	***
2	17x4/IL15/Oligo	+	-	(*)
	17x4/IL15/Oligo	+	+	*
3	17x4/IL15/Oligo/GS	+	-	(*)
	17x4/IL15/Oligo/GS	+	+	***
4	17x4/IL15/Oligo/IVS8/GS	+	-	-
	17x4/IL15/Oligo/IVS8/GS	+	+	***
5	pcDNA3switch	+	-	***
	pcDNA3switch	+	+	*****
6	pGene/V5-His/lacZ	-	-	-

\*: Maß für Färbeintensität

Ohne Genschalter (2.) war keine signifikante Blaufärbung von Zellen zu beobachten. In Zellen, die mit autoreguliertem Genschalter transfiziert worden waren (3.+4.), bewirkte Mifepriston-Stimulierung eine deutliche Blaufärbung von 3-5 % der Zellen.

Da diese niedrige Zellanzahl eine MutIL-15/mFc-Menge produziert, die nur sehr gering ist, liegt sie unter der Nachweisgrenze des ELISA. Die lacZ Färbung jedoch kann die Genschalteraktivität auch in einzelnen Zellen erfassen und nachweisen.

Diese Experimente beweisen, dass der aktivierte Genschalter, der durch die Konstrukte 17x4/IL15/Oligo/GS und 17x4/IL15/Oligo/IVS8/GS nach Stimulierung mit Mifepriston bereitgestellt wird, die Transkription von lacZ bewirken kann. Damit beweisen diese Daten die Funktionalität des autoregulierten Genschalters der oben genannten Konstrukte.

#### Beispiel 5: Herstellung und Charakterisierung transgener Mäuse

50  $\mu$ g DNA der Konstrukte 17x4/IL15/Oligo/GS und 17x4/IL15/Oligo/IVS8/GS wurden mit den Restriktionsenzymen Eco47III und NotI geschnitten und die gewünschten Fragmente der Länge 4800 bp bzw. 4924 bp aufgereinigt. Anschließend wurden die Fragmente in die Vorkerne von C3HeB/FeJ Mäusen injiziert und die Embryonen anschließend in scheinsschwangere Weibchen implantiert. Von den erhaltenen Mäusen wurde die genomische DNA extrahiert und mit Hilfe von PCR-Analyse auf die Integration des Transgens untersucht. Für die PCR-Analyse wurden folgende Primer verwendet: GS-IL15FW.2 (5'- TAT GGC TTC TGA GGC GGA AAG AAC CAG C - 3') und GS-L15 RV.3 (5'- G CAG AGA CCC CAT GGG CAT GGT GGC TAG - 3'). Die erhaltenen PCR-Produkte haben dementsprechend eine Länge von 211 bp (ohne Intron) bzw. 335 bp (mit Intron IVS8).

Von 44 erhaltenen Mäusen der Oocyteninjektion des Konstruktes 17x4/IL15/Oligo/GS waren 16 Tiere transgen (36%).

Die Founder-Tiere (F0 Generation) wurden mit Wildtyp-DBA/2 Mäusen verpaart und die erhaltene F1-Nachkommen wiederum auf genomische Präsenz des Transgens untersucht. Die transgenen F1 Tiere wurden anschließend auf regulierte Expression von MutIL-15/mFc untersucht. Im Alter von ca. 8-16 Wochen wurde den Tieren 250 µg/kg in Sesamöl gelöstes Mifepriston (Sigma, Deisenhofen M 8046) jeden zweiten Tag insgesamt dreimal intraperitoneal injiziert. Einen Tag nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und aus den Geweben RNA bzw. Protein extrahiert. Anschließend wurde die Expression von Genschalterprotein bzw. Immunmodulator in den Geweben mit Hilfe von ELISA und Western Blot analysiert. Die RNA-Menge wird mittels einer quantitativen Reverse-Transkription PCR (RT-PCR) bestimmt, um die Menge an transkribiertem Genschalter bzw. Immunmodulator zu ermitteln.

Je 1 µg RNA werden mit Hilfe der Expand Reverse Transcriptase (Roche, Mannheim) nach Anleitung des Herstellers in cDNA transkribiert. Anschließend wird die Expression des Genschalters bzw. des Immunmodulators MutIL15/mFc mit Hilfe des Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green Kits (Roche, Mannheim) quantitativ untersucht. Die PCR Bedingungen für die Detektion des Immunmodulators sind wie folgt:

Denaturierung: 95°C, 600 sec

Zyklen: 95°C 15 sec, 60°C 5 sec, 72 °C 10 sec.

Primer CD5.6-FW: 5'-CCTGCTGGGGATGCTGGTC

Primer CD5.6-RV: 5'-TTTTCCTCCAGTTCCTCACATTC

MgCl<sub>2</sub>: 3 mM

Die PCR Bedingungen für die Detektion des Genschalters sind wie folgt:

Denaturierung: 95°C, 600 sec

Zyklen: 95°C 15 sec, 53°C 5 sec, 72 °C 10 sec.

Primer GS-FW: 5'-GACTTAAAAAGCTCAAGTGCTCCAAAG

Primer GS-RV: 5'-TATATCCTGTAAAGAATCCAT

MgCl<sub>2</sub>: 3 mM

Außerdem wird den Tieren in regelmäßigen Abständen vor bzw. während der Mifepriston-Behandlung Blut entnommen und die darin enthaltenen MutIL-15/mFc Menge über ELISA bestimmt.

Zum Vergleich dienen gleichaltrige Mäuse derselben transgenen Linie, die zuvor nicht mit Mifepriston behandelt worden waren.

Alternativ werden die transgenen Mäuse in einem Zwei-Schritt-Verfahren hergestellt. Zuerst werden

zwei verschiedene Linien transgener Mäuse generiert, die entweder lediglich das Genschaltermolekül (Linien „A“) oder nur den durch die Genschalterbindungsstelle regulierten Immunmodulator (Linien „B“) exprimieren. Von den erhaltenen transgenen Mäusestämmen der A-Linien werden diejenigen Tiere ausgewählt, die geeignete Mengen Genschaltermolekül exprimieren und in einem zweiten Schritt mit transgenen Tieren der B-Linien verpaart. Die erhaltenen Nachkommen werden danach auf simultane Expression der beiden Transgene untersucht. Auf diese Weise werden doppelt transgenen Linien „A/B“ erhalten, die durch Genschaltermoleküle regulierten Immunmodulator exprimieren. 50 µg DNA der Konstrukte pswitch (für Linien „A“) bzw. 17x4/IL15/Oligo und 17x4/IL15/Oligo/IVS8 (für Linien „B“) werden mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und die gewünschten Fragmente aufgereinigt. Anschließend werden die Fragmente in die Vorkerne von C3HeB/FeJ Mäusen injiziert und die Embryonen anschließend in scheinchwangere Weibchen implantiert. Von den erhaltenen Mäusen wird die genomische DNA extrahiert und mit Hilfe von PCR-Analyse auf die Integration des Transgens untersucht.

#### Beispiel 6: Transplantation von Inseln aus Spenderorganen transgener Mäuse

Bei der Inseltransplantation werden Inseln, die aus Pankreata von Mäusen isoliert werden, unter die Nierenkapsel von diabetischen Mäusen injiziert (Ferrari-Lacraz et al., The Journal of Immunology, 2001, Vol.167 S. 3478-3485). Spender-Inseln werden aus transgenen Mäusen des Stammes DBA/2J isoliert, die MutIL-15/mFc unter Kontrolle des Genschalters exprimieren. Die Spender-Mäuse werden mit Mifepriston (250 µg/kg) vorbehandelt, so dass sie am Tag der Organentnahme nachweisbar MutIL-15/mFc produzieren. Zur Präparation der Inseln werden Donor Pankreata in situ mit Typ IV Collagenase (2 mg/ml; Worthington Biochemical Corp.) perfundiert. Nach 30 Minuten Verdau bei 37 °C werden die Inseln über einen diskontinuierlichen Ficoll-Gradienten aufgereinigt und anschließend in RPMI1640 Medium (Gibco, Karlsruhe) mit 5,6 mM Glucose kultiviert. Anschließend werden 300-400 Inseln unter die Nierenkapsel des Empfängers transplantiert.

Der Empfänger ist eine 6-10 Wochen alte nicht transgene B6AF1 Maus, bei der durch intraperitoneale Injektion des Betazelltoxins Streptozotocin (225 mg/kg; Sigma, Deisenhofen) Diabetes induziert wurde. Als Kontrolle werden syngene Inseln (d.h., Inseln von B6AF1-Mäusen) in die diabetischen Mäuse transplantiert.

Pankreatische Inseln werden aseptisch unter die linke Nierenkapsel transplantiert. Dazu wird die Maus narkotisiert und ein Einschnitt unter dem linken Rippenbogen durchgeführt. Die linke Niere wird aus dem Bauchraum herausmobilisiert und der untere Pol der Nierenkapsel kurz eingeschnitten. Mit einer stumpfen sterilen Kanüle wird eine Tasche unter der Nierenkapsel geformt. Die Inseln werden

anschließend mit einer sterilen Pipettenspitze in diesen Hohlraum injiziert. Danach wird die Niere in den Bauchraum zurückgelegt und das Abdomen geschlossen. Die Empfängertiere werden ab dem Transplantationstag jeden zweiten Tag mit Mifepriston 250 µg/kg behandelt, so dass sie kontinuierlich MutIL-15/mFc produzieren.

Die Funktion des Allotransplantats wird über regelmäßige Blutglukosemessungen (Accu-Check III; Boehringer Mannheim, Mannheim) verfolgt. Vor und nach der Diabetesinduktion sowie nach der Inseltransplantation wird den Tieren regelmäßig Blut aus der Schwanzvene bzw. dem retrobulbären Venenplexus entnommen und der Blutzuckerspiegel bestimmt. Zusätzliche Kontrollen zwischen den Blutabnahmen finden mit Urinteststreifen statt. Die primäre Transplantatfunktion wird als Blutzuckergehalt unter 11,1 mmol/l (200 mg/dl) an Tag 3-5 nach der Transplantation definiert. Das Transplantat gilt als abgestoßen, wenn der Blutzuckerspiegel an mindestens zwei aufeinanderfolgenden Tagen auf über 500 mg/dl angestiegen ist, nachdem man eine primäre Transplantatfunktion beobachtet.

Als Kontrolle werden Inseltransplantationen durchgeführt, bei denen die Tiere entweder kein Mifepriston erhalten und somit auch kein Genschalter-reguliertes MutIL-15/mFc exprimieren oder bei denen die Tiere die mit externer Zugabe von MutIL-15/mFc behandelt werden.

Die Tiere, die auf die beschriebene Weise behandelt werden, können nach der Transplantation von Inselzellen, die aus transgenen Spendermäusen gewonnen werden, ihren Blutzuckerspiegel besser regulieren und zeigen bei Behandlung mit Mifepriston eine verminderte Abstoßung der Zelltransplantate.

#### Beispiel 7: Heterotopie Herztransplantation

Bei der heterotopen Herztransplantation wird das Spenderherz mit den großen Gefäßen im Abdomen des Empfängers verbunden (Ono et al., J. Cardiovasc. Surg. 1969, Corry et al., Transplantation 1973). Spenderherzen werden aus transgenen Mäusen des Stammes DBA/2J isoliert, die MutIL-15/mFc unter Kontrolle des Genschalters exprimieren. Die Spender-Mäuse werden mit Mifepriston (250 µg/kg) vorbehandelt, so dass sie am Tag der Organentnahme nachweisbar MutIL-15/mFc produzieren. Bei den anästhesierten Mäusen wird die Vena cava isoliert und Heparin (400 U/kg) zur Verteilung über den gesamten Kreislauf injiziert. Anschließend werden die Tiere durch Teilung der abdominalen Gefäße ausgeblutet und das Herz mit Hilfe einer medianen Sternotomie freigelegt. Die Aorta und die pulmonaren Gefäße werden isoliert und geteilt und die pulmonären Venen und die Vena cava en masse mit 4-10 Tevdek (Deknatl, Queens Village) ligiert. Das Herz wird unmittelbar nach seiner Entnahme bei 4 °C in physiologischer Kochsalzlösung (Physiolosol, Abbot Laboratories, Illinois, USA) aufbewahrt. Die Vena cava inferior und Aorta abdominalis des Empfängers (6-8 Wochen alte nicht

transgene B6AF1 Maus) werden freipräpariert und die Gefäße mit locker liegenden Gefäßklammern versehen. Das Ende der Spender-Aorta wird mit der Seite der Empfänger-Aorta abdominalis mit einem 8-0 Prolen-Faden verbunden. Die A. pulmonalis des Spenders wird mit der Vena cava des Empfängers auf die gleiche Weise fusioniert. Die Gefäßklammern werden entfernt und das Spender-Herz mit 37 °C warmer Ringer's Laktatlösung erwärmt, so dass spontan die Herzkontraktion wieder einsetzt. Die Empfängertiere werden ab dem Transplantationstag jeden zweiten Tag mit Mifepriston 250 µg/kg behandelt, so dass sie kontinuierlich MutIL-15/mFc produzieren. Das Überleben des Transplantats wird jeden zweiten Tag durch Abtasten des schlagenden Herzens durch die Bauchwand überprüft und auf einer Skala von 1+ bis 4+ anhand der Impuls-Stärke und -Rate bewertet. Das Herz gilt als abgestoßen, wenn keine Herzmuskelkontraktionen mehr fühlbar sind. Eine Verhinderung der Abstoßung wird erzielt, wenn die Spender-Herzen über einen längeren Zeitraum schlagen als Herzen in unbehandelten Kontrolltieren. Als Kontrolle werden Herztransplantationen durchgeführt, bei denen die Tiere entweder kein Mifepriston erhalten und somit auch kein Genschalter-reguliertes MutIL-15/mFc exprimieren oder bei denen die Tiere die mit externer Zugabe von MutIL-15/mFc behandelt werden.

Dieses Beispiel zeigt, dass die heterotopen Herztransplantate in denjenigen Tieren, die mit Mifepriston behandelt werden, im Vergleich zu den unbehandelten Tieren länger funktionsfähig bleiben.

#### Beispiel 8: Herstellung transgener ES-Zelllinien

100 µg DNA der Konstrukte 17x4/IL15/Oligo/RIPnh/GS, 17x4/IL15/Oligo/RIPnh/GS, 17x4/IL15/Oligo/RIPnh/IVS8/GS und 17x4/IL15/Oligo/RIPnh/IVS8/GS wurden mit den Restriktionsenzymen Eco47III und NotI geschnitten, die Fragmente aufgereinigt und in mindestens 100 µl sterilem PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Konstrukte 17x4/IL15/Oligo/RIPnh/GS und 17x4/IL15/Oligo/RIPnh/IVS8/GS durch Elektroporation in Maus-ES-Zellen der Linie SVJ129 oder R1 eingebracht. Dazu wurden exponentiell wachsende Maus-ES Zellen trypsiniert, vereinzelt und gezählt. Ca.  $3 \times 10^7$  Zellen wurden zweimal mit 5-10 ml kaltem PBS gewaschen und danach das Zellpellet in kaltem PBS aufgenommen, so dass das Endvolumen inklusive DNA 800 µl beträgt. Anschließend wurde die verdaute DNA zu den Zellen gegeben, die Lösung gemischt und mindestens 10 Minuten auf Eis inkubiert. Unter der Sterilbank wurde das Zell/DNA-Gemisch in vorgekühlte Elektroporationsküvetten mit einem Elektrodenspalt von 0,4 cm (BioRad, München) eingefüllt. Die Elektroporation wurde mit einem Genepulser-2 Gerät (BioRad, München) bei 0,8 kV und 3 µF durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit ES-Zellmedium (DMEM mit 20 mM Hepes, 15 % hitzeinaktiviertes FCS, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 0,1 mM nichtessentielle Aminosäuren, 0,1 mM Mercaptoethanol,  $10^3$  U/ml Leukemia Inhibitory Factor) gemischt und gleichmäßig auf zehn mit 0,1 % Gelatine beschichtete 10 cm Zellkulturschalen verteilt. Am nächsten

Tag wurde die Selektion durch Zugabe von 200 µg/ ml Hygromycin (Sigma, Deisenhofen H 3274) in ES-Zellmedium begonnen. Die Zellen wurden für ca. 5-9 Tage auf Aufnahme des Konstruktes selektioniert und einzelne transgene Klone unter der Sterilbank von Hand isoliert und auf 96-Lochplatten überführt. Die Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz passagiert und sukzessive auf 48-Lochplatten, 24-Lochplatten, 6 Loch-Platten und 10 cm-Schalen umgesetzt.

Die Zellklone wurden nach Zugabe von 10 nM Mifepriston auf regulierbare Expression des Genschalters und MutIL-15/mFc mittels quantitativer RT-PCR bzw. von MutIL-15/mFc mit Hilfe von ELISA und Western Blot Assays (wie oben in Beispiel 3 und 4 beschrieben) untersucht.

Alternativ werden die transgenen ES-Zellen in einem 2-Schritt-Verfahren hergestellt. Zuerst werden transgene ES-Zellen generiert, die lediglich das Genschaltermolekül reguliert exprimieren. Von den erhaltenen transgenen Zelllinien werden diejenigen Klone ausgewählt, die geeignete Mengen Genschaltermolekül exprimieren. In einem zweiten Schritt werden diese Klone mit DNA-Konstrukten, die den durch eine Genschalterbindungsstelle regulierten Immunmodulator kodieren, supertransfiziert. Die erhaltenen doppelt-transgenen Linien werden wie in Beispiel 5 beschrieben durch RT-PCR auf simultane Expression der beiden Transgene untersucht. Auf diese Weise werden doppelt transgenen ES-Zellen erhalten, die durch Genschaltermoleküle regulierten Immunmodulator exprimieren.

100 µg DNA des Genschalter-Konstruktes werden mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten, das gewünschte Fragment aufgereinigt, in sterilem PBS resuspendiert und wie oben beschrieben durch Elektroporation in ES-Zellen eingebracht. Da das Konstrukt eine Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin vermittelt, können die Zellen durch Behandlung mit diesem Antibiotikum auf erfolgreiche Transfektion selektioniert werden. Von den erhaltenen Zellen werden transgene Klone isoliert und die Expression des Genschaltermoleküls in Abhängigkeit von Mifepriston-Zugabe durch quantitative RT-PCR untersucht. Diejenigen Klone, die geeignete Mengen des Genschaltermoleküls exprimieren, werden in einem zweiten Schritt durch erneute Elektroporation mit aufgereinigten Eco47III/NotI-Fragmenten der Konstrukte 17x4/IL15/Oligo/RIPhn und 17x4/IL15/Oligo/RIPhn/TVS8 super-transfiziert und durch Hygromycin-Behandlung auf Aufnahme des zweiten Transgens selektioniert. Die simultane Integration beider Transgene wird mittels PCR-Analyse der genomischen DNA überprüft.

Die erhaltenen doppelt-transgenen Zellklone werden nach Zugabe von 10 nM Mifepriston auf regulierbare Expression des Genschalters und MutIL-15/mFc mittels quantitativer RT-PCR bzw. von MutIL-15/mFc-Protein mit Hilfe von ELISA und Western Blot Assays wie bereits oben in Beispiel 5 beschrieben untersucht. Anschließend werden von den erhaltenen Zelllinien diejenigen Klone ausgewählt, die nur nach Zugabe von Mifepriston den Immunmodulator MutIL-15/mFc in ausreichenden Mengen herstellen und sezernieren.



Beispiel 9: Transplantation von Insulin-produzierenden Zellen, die aus transgenen ES-Zellen hergestellt werden

Vor der Transplantation werden aus undifferenzierten Hygromycin-resistenten ES-Zellklonen Insulin-produzierende Zellen hergestellt, die unter der Kontrolle des Genschalters MutIL-15/mFc exprimieren Soria et al. (Diabetes. 2000 Feb.; 49 (2): 157-62.

Die Insulin-produzierenden Zellen werden vor der Transplantation mit Mifepriston behandelt, so dass sie ausreichende Mengen MutIL-15/mFc produzieren. Anschließend werden 1 Mio Insulin-produzierende Zellen in durch Streptozotocin-Behandlung diabetische C57BL/6 Mäuse entweder unter die Nierenkapsel (wie in Beispiel 7 beschrieben) oder in die Milz (Soria et al. (Diabetes. 2000 Feb.; 49 (2): 157-62) injiziert. Die Empfängertiere werden ab dem Transplantationstag jeden zweiten Tag mit Mifepriston (250 µg/kg) behandelt, so dass sie kontinuierlich MutIL-15/mFc produzieren.

Die Funktion des Allotransplantats wird über regelmäßige Blutglukosemessungen (Accu-Check III; Boehringer Mannheim, Mannheim) verfolgt. Die primäre Transplantatfunktion wird als Blutzuckergehalt unter 11,1 mmol/l (200 mg/dl) an Tag 3-5 nach der Transplantation definiert. Das Transplantat gilt als abgestoßen, wenn der Blutzuckerspiegel an mindestens zwei aufeinanderfolgenden Tagen auf über 500 mg/dl ansteigt, wenn zuvor eine primäre Transplantatfunktion beobachtet wird.

Als Kontrolle werden Insulin-produzierende Zellen in Empfänger-Tiere transplantiert, die aus dem gleichen Zellklon hergestellt wurden, aber nicht mit Mifepriston vorbehandelt sind und somit auch kein Genschalter-reguliertes MutIL-15/mFc exprimieren. Alternativ können auch Insulin-produzierende Zellen verwendet werden, die zwar das MutIL-15/mFc-Konstrukt, nicht aber den Genschalter enthalten

Weiterhin dienen Tiere als Kontrolle, die nach Erhalt von aus Stammzellen abgeleitete Insulin-produzierende Zellen mit externer Zugabe von MutIL-15/mFc behandelt werden.

Untersuchungen des Blutzuckerspiegels von Tieren, die aus Stammzellen hergestellte Insulin-produzierende Zellen erhalten haben, zeigen, dass Zelltransplantate in mit Mifepriston behandelten Tieren längere Zeit funktionell aktiv sind.

### Patentansprüche

1. Humane oder tierische nicht-totipotente Zelle enthaltend mindestens eine Nukleinsäure kodierend für mindestens einen Immunmodulator unter der Kontrolle eines durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbaren Genexpressionssystems.
2. Zelle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Zelle um eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle handelt.
3. Zelle nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.
4. Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 in Form einer Zelllinie.
5. Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, dass das regulierbare Genexpressionssystem ein Progesteron-Genexpressionssystem, ein Tetracyclin-Expressionssystem und/oder ein Rapamycin-Genexpressionssystem ist.
6. Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass der Immunmodulator mindestens eine der folgenden funktionellen Eigenschaften aufweist:
  - a. die Inhibierung einer Antigenerkennung, die durch T-Zellen vermittelt wird
  - b. die Inhibierung eines über einen Rezeptor auf einer T-Zelle vermittelten Signals,
  - c. die Aktivierung eines über einen Rezeptor auf einer T-Zelle vermittelten Signals,
  - d. die Inhibierung des Wachstums von T-Zellen,
  - e. die Inhibierung von Molekülen die das Überleben von T-Zellen unterstützen
  - f. die Inhibierung von Effektormolekülen von T-Zellen(wie TNF-alpha, IFN-gamma),
  - g. die Inhibierung der Adhäsion von T-Zellen,
  - h. die Inhibierung einer T-Zell-kostimulatorischen Interaktion (die Aktivierung eines Lymphozyten erfolgt über zwei Signale: zum einen erfolgt eine Stimulierung über den Antigenrezeptor, zum anderen erfolgt ein weiteres Signal zur klonalen Expansion und Differenzierung eines ungeprägten Lymphozyten; diese kostimulatorische Interaktion kann durch einen Immunmodulator inhibiert werden)
  - i. die Inhibierung der Aktivierung, der Proliferation, des Überlebens, der Antigenpräsentation,

des Signalisierens, und/oder der Effektorfunktionen von weiteren Zellen, die an einer Immunantwort beteiligt sind, wie z.B. allgemeine und spezielle antigenpräsentierende Zellen, insbesondere z.B. dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen B-Zellen, neutrophile Granulozyten und NK Zellen die Inhibierung der zellulären Interaktion von unterschiedlichen Zellen, entweder über Oberflächenrezeptoren oder über sekretierte Moleküle, wie z.B. Zytokine, Chemokine oder Wachstumsfaktoren, die an einer Immunantwort beteiligt sind, wie z.B. allgemeine und spezielle antigenpräsentierende Zellen, insbesondere z.B. dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen, neutrophile Granulozyten und NK Zellen,

- j. die Inhibierung der Migration von Zellen, die an einer Immunantwort beteiligt sind, wie z.B. spezielle antigenpräsentierende Zellen, insbesondere z.B. dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen, neutrophile Granulozyten und NK Zellen,
  - k. die Inhibierung von Komponenten des Komplementsystems
  - l. die Inhibierung von phagozytotischen Aktivitäten im Zusammenhang mit der Präsentation von Fremd- oder Autoimmunantigenen, oder durch die Bindung von Antikörpern an Antigene, und/oder
  - m. die Inhibierung von Entzündungsreaktionen.
7. Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Immunmodulator ein Antikörper ist.
8. Zelle nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Fc-Fragment des Antikörpers ein IgG, insbesondere ein humanes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 oder ein analoges Säugetier IgG oder ein IgM, insbesondere ein humanes IgM oder ein analoges Säugetier IgM ist.
9. Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Immunmodulator
- a. ein Rezeptor ist
  - b. ein löslicher sekretierter Rezeptor ist
  - c. ein sekretiertes Protein oder Peptid ist
10. Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure zusätzlich eine Selektionskassette, insbesondere ein geeignetes Transfektions-Markergen und/oder Differenzierungs-Markergen, kodiert.

11. Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure zusätzlich ein Molekül kodiert, das NK-Zellen- und/oder Killerzellen inhibiert.
12. Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure zusätzlich ein Molekül kodiert, dass
  - a. Dendritische Zellen inhibiert
  - b. Monocyten und oder Makrophagen inhibiert
  - c. B-Zellen inhibiert
  - d. Polmorphnukleäre Zellen, z.B. Neutrophile Granulozyten inhibiert
13. Zelle nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das genannte inhibierende Molekül ein humanes MHC-Klasse-I-Molekül, ein chimeres MHC-Klasse-I-Molekül oder ein virales MHC-Klasse-I-Homolog ist.
14. Nukleinsäure kodierend für mindestens einen Immunmodulator und mindestens ein durch Zugabe einer Wirksubstanz regulierbares Genexpressionssystem.
15. Vektor enthaltend mindestens eine Nukleinsäure nach Anspruch 14.
16. Arzneimittel, enthaltend mindestens eine Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 13 und geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.
17. Humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder humanes oder tierisches Säugetierorgan, enthaltend mindestens eine Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 13.
18. Transgenes nicht-humanes Säugetier, enthaltend mindestens eine Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 13.
19. Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 13 und/oder eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 17 zur Transplantation in ein humanes oder tierisches Säugetier.
20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine Allo-, Auto- oder Xenotransplantation handelt.

21. Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 13, einer Nukleinsäure nach Anspruch 14, eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 17 zur Inhibierung einer Transplantatabstoßungsreaktion in einem humanen oder tierischen Säugetier, gegebenenfalls in Anwesenheit mindestens eines Immunmodulators.
22. Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 13, einer Nukleinsäure nach Anspruch 14, eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 17 zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolgeerkrankungen und/oder Autoimmunerkrankungen.
23. Verfahren zur Herstellung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 13 enthaltend folgende Schritte:
  - c. Einbringen mindestens einer Nukleinsäure nach Anspruch 14 und/oder mindestens eines Vektors nach Anspruch 15 in eine transplantierbare humane oder tierische nicht-totipotente Zelle, und
  - d. Expression der Nukleinsäure unter Zugabe mindestens einer geeigneten Wirksubstanz zur Regulierung des Genschalters.
24. *In vitro*-Verfahren zur Herstellung eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 17, enthaltend die folgenden Schritte:
  - e. Einbringen sowohl mindestens einer Nukleinsäure nach Anspruch 14 und/oder mindestens eines Vektors nach Anspruch 15 und als auch mindestens eines Differenzierungs-Markergens in mindestens eine nicht-totipotente Stammzelle, eine nicht-totipotente Vorläuferzelle und/oder eine nicht-totipotente immortalisierte Zelle,
  - f. Differenzierung der Zelle aus Schritt a.,
  - g. Selektionieren der differenzierten Zelle aus Schritt b. und
  - h. Einbringen der selektierten Zelle aus Schritt c. in ein humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder in ein humanes oder tierisches Säugetierorgan.
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass nach, vor oder gleichzeitig mit Schritt a. mindestens ein geeignetes Transfektions-Markergen in mindestens eine nicht-totipotente Stammzelle, eine nicht-totipotente Vorläuferzelle und/oder eine nicht-totipotente immortalisierte Zelle eingebracht wird und nach Schritt a. vorzugsweise die transfektierte Zelle aus Schritt a.

selektioniert wird.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.
27. Verfahren zur Erzeugung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach Anspruch 18, enthaltend folgende Schritte:
  - f. Einbringen sowohl mindestens einer Nukleinsäure nach Anspruch 14 und/oder mindestens eines Vektors nach Anspruch 15 als auch mindestens eines geeigneten Transfektions-Markergens in mindestens eine Oocyte, Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle eines nicht-humanen Säugetieres,
  - g. Selektionieren der transfizierten Zelle aus Schritt a.,
  - h. Einbringen der nach Schritt b. selektierten Zelle in mindestens eine nicht-humane Säugetier-Blastozyste,
  - i. Einbringen der Blastozyste aus Schritt c. in eine nicht-humane Säugetier-Pflegemutter und
  - j. Identifizierung des sich aus genannter Blastozyste entwickelten transgenen nicht-humanen Säugetiers.
28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.
29. Verfahren zur Erzeugung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach Anspruch 18, enthaltend folgende Schritte:
  - d. Einbringen sowohl mindestens einer Nukleinsäure nach Anspruch 14 und/oder mindestens eines Vektors nach Anspruch 15 als auch mindestens eines geeigneten Transfektions-Markergens in einen der beiden Vorkerne einer befruchteten nicht-humanen Säugetier-Oocyte,
  - e. Einbringen der Säugetier-Oocyte aus Schritt a. in eine nicht-humane Säugetier-Pflegemutter und
  - f. Identifizierung des sich aus genannter Säugetier-Oocyte entwickelten transgenen nicht-humanen Säugetiers.
30. Transgenes nicht-humanes Säugetier, dadurch gekennzeichnet, dass es nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 27 oder 28 erzeugt wurde.

31. Transgenes nicht-humanen Säugetier, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Nachkomme des Säugetieres nach Anspruch 29 ist.
32. Verwendung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach einem der Ansprüche 18, 29 oder 30 zur Gewinnung einer nicht-humanen Zelle, eines nicht-humanen organspezifischen Gewebes und/oder eines nicht-humanen Säugetierorgans für die Allo- und/oder Xenotransplantation.
33. Verwendung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach einem der Ansprüche 18, 29 oder 30, eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 17 zum Auffinden von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen und/oder zur Identifizierung von toxischen Substanzen.

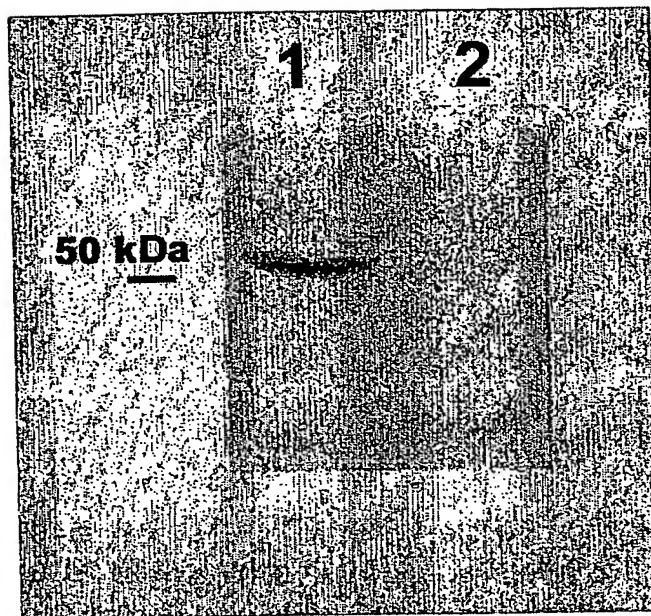


Fig. 1



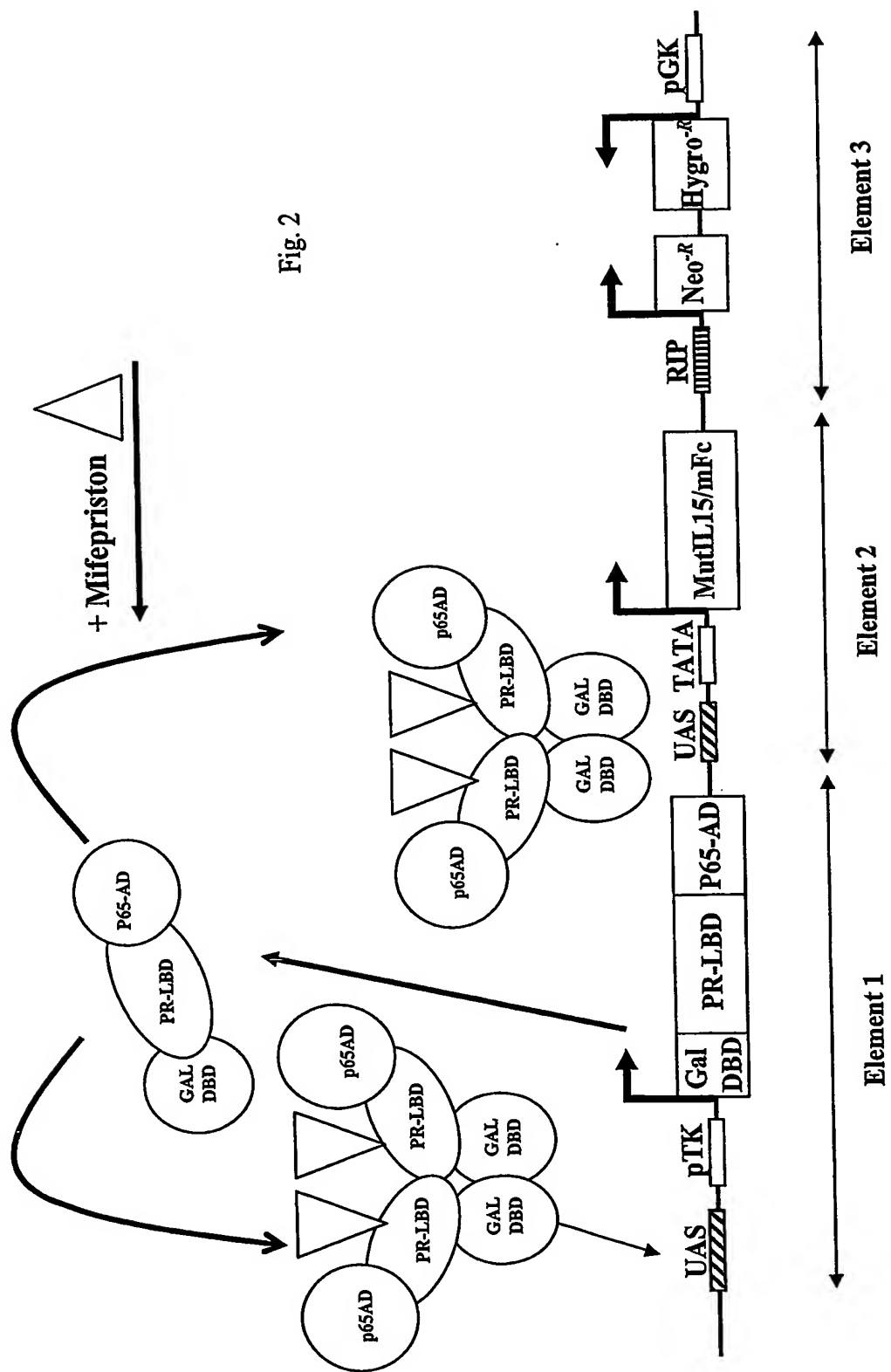


Fig. 2

Organization Applicant

-----  
Street : Max-Planck-Straße 15a  
City : Erkrath  
State :  
Country :  
PostalCode :  
PhoneNumber : 0211/2056582  
FaxNumber : 0211/2056592  
EmailAddress : timm@cardion.de  
<110> OrganizationName : Cardion AG

Application Project

-----  
<120> Title : Transplantierbare Zelle und ihre Verwendung zur Prop  
hylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolge - und/oder Auto  
immunkrankheiten  
<130> AppFileReference : 2002CAR003DE  
<140> CurrentAppNumber :  
<141> CurrentFilingDate : \_\_\_\_-\_\_-\_\_

Sequence

-----  
<213> OrganismName : Artificial Sequence  
<400> PreSequenceString :  
tatggcttct gaggcggaaa gaaccagc  
28  
<212> Type : DNA  
<211> Length : 28  
SequenceName : GS-IL15FW.2  
SequenceDescription :

Custom Codon

-----  
Sequence Name : GS-IL15FW.2

Sequence

-----  
<213> OrganismName : Artificial Sequence  
<400> PreSequenceString :  
gcagagaccc catgggcatg gtggctag  
28  
<212> Type : DNA  
<211> Length : 28  
SequenceName : GS-IL15RV.3  
SequenceDescription :

Custom Codon

-----  
Sequence Name : GS-IL15RV.3

Sequence

sequenzprotokoll1.WorkFile

-----

<213> OrganismName : Artificial  
<400> PreSequenceString :  
cctgctgggg atgctggtc  
19  
<212> Type : DNA  
<211> Length : 19  
SequenceName : PrimerCD5.6-FW  
SequenceDescription :

Custom Codon

-----

Sequence Name : PrimerCD5.6-FW

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial  
<400> PreSequenceString :  
ttttcctcca gttcctcaca ttc  
23  
<212> Type : DNA  
<211> Length : 23  
SequenceName : PrimerCD5.6-RV  
SequenceDescription :

Custom Codon

-----

Sequence Name : PrimerCD5.6-RV

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial  
<400> PreSequenceString :  
gacttaaaaa gctcaagtgc tccaaag  
27  
<212> Type : DNA  
<211> Length : 27  
SequenceName : PrimerGS-FW  
SequenceDescription :

Custom Codon

-----

Sequence Name : PrimerGS-FW

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial  
<400> PreSequenceString :  
tatatcctgt aaagaatcca t  
21  
<212> Type : DNA  
<211> Length : 21

sequenzprotokoll.WorkFile  
SequenceName : PrimerGS-RV  
SequenceDescription :

Custom Codon

-----

Sequence Name : PrimerGS-RV